

**CYCLISCHES ADENOSINMONOPHOSPHAT
IM URIN:
ÜBER BESTIMMUNGSMETHODEN UND
DIAGNOSTISCHE WERTIGKEIT BEI
ERKRANKUNGEN DER NEBENSCHILDDRÜSE**

Rainer Deckardt

1976

AUS DER II. MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
DIREKTOR: PROFESSOR DR. MED. E. BUCHBORN

CYCLISCHES ADENOSINMONOPHOSPHAT IM URIN:
ÜBER BESTIMMUNGSMETHODEN UND DIAGNOSTISCHE WERTIGKEIT
BEI ERKRANKUNGEN DER NEBENSCHILDDRÜSE

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
AN DER LUDWIG MAXIMILIANS - UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

vorgelegt von

Rainer Deckardt

aus

München

1976



Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr.med. P.C. Scriba

Mitberichterstatter:

Prof. Dr.med. E. Buchborn

Dekan:

Prof. Dr.med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung:

6.8.1976

QUALITÄTSKONTROLLE

Seite

4	SIGNATURE	5
1	QUALITÄTSKONTROLLE UND VERGABE	1
1.1	Qualitätsmanagement und Qualität des Produkts	2
2.1.1	Qualitätsmanagement, T.M. und T.M.	3
2.1.1.1	Qualitätsmanagement	3
2.1.1.2	Qualitätsmanagement	4
2.1.1.3	Qualitätsmanagement	5
2.1.1.4	Qualitätsmanagement	6
2.1.1.5	Qualitätsmanagement	7
2.1.1.6	Qualitätsmanagement	8
2.1.1.7	Qualitätsmanagement	9
2.1.1.8	Qualitätsmanagement	10
2.1.1.9	Qualitätsmanagement	11
2.1.1.10	Qualitätsmanagement	12
2.1.1.11	Qualitätsmanagement	13
2.1.1.12	Qualitätsmanagement	14
2.1.1.13	Qualitätsmanagement	15
2.1.1.14	Qualitätsmanagement	16
2.1.1.15	Qualitätsmanagement	17
2.1.1.16	Qualitätsmanagement	18
2.1.1.17	Qualitätsmanagement	19
2.1.1.18	Qualitätsmanagement	20
2.1.1.19	Qualitätsmanagement	21
2.1.1.20	Qualitätsmanagement	22
2.1.1.21	Qualitätsmanagement	23
2.1.1.22	Qualitätsmanagement	24
2.1.1.23	Qualitätsmanagement	25
2.1.1.24	Qualitätsmanagement	26
2.1.1.25	Qualitätsmanagement	27
2.1.1.26	Qualitätsmanagement	28
2.1.1.27	Qualitätsmanagement	29
2.1.1.28	Qualitätsmanagement	30
2.1.1.29	Qualitätsmanagement	31
2.1.1.30	Qualitätsmanagement	32
2.1.1.31	Qualitätsmanagement	33
2.1.1.32	Qualitätsmanagement	34
2.1.1.33	Qualitätsmanagement	35
2.1.1.34	Qualitätsmanagement	36
2.1.1.35	Qualitätsmanagement	37
2.1.1.36	Qualitätsmanagement	38
2.1.1.37	Qualitätsmanagement	39
2.1.1.38	Qualitätsmanagement	40
2.1.1.39	Qualitätsmanagement	41
2.1.1.40	Qualitätsmanagement	42
2.1.1.41	Qualitätsmanagement	43
2.1.1.42	Qualitätsmanagement	44
2.1.1.43	Qualitätsmanagement	45
2.1.1.44	Qualitätsmanagement	46
2.1.1.45	Qualitätsmanagement	47
2.1.1.46	Qualitätsmanagement	48
2.1.1.47	Qualitätsmanagement	49
2.1.1.48	Qualitätsmanagement	50
2.1.1.49	Qualitätsmanagement	51
2.1.1.50	Qualitätsmanagement	52
2.1.1.51	Qualitätsmanagement	53
2.1.1.52	Qualitätsmanagement	54
2.1.1.53	Qualitätsmanagement	55
2.1.1.54	Qualitätsmanagement	56
2.1.1.55	Qualitätsmanagement	57
2.1.1.56	Qualitätsmanagement	58
2.1.1.57	Qualitätsmanagement	59
2.1.1.58	Qualitätsmanagement	60
2.1.1.59	Qualitätsmanagement	61
2.1.1.60	Qualitätsmanagement	62
2.1.1.61	Qualitätsmanagement	63
2.1.1.62	Qualitätsmanagement	64
2.1.1.63	Qualitätsmanagement	65
2.1.1.64	Qualitätsmanagement	66
2.1.1.65	Qualitätsmanagement	67
2.1.1.66	Qualitätsmanagement	68
2.1.1.67	Qualitätsmanagement	69
2.1.1.68	Qualitätsmanagement	70
2.1.1.69	Qualitätsmanagement	71
2.1.1.70	Qualitätsmanagement	72
2.1.1.71	Qualitätsmanagement	73
2.1.1.72	Qualitätsmanagement	74
2.1.1.73	Qualitätsmanagement	75
2.1.1.74	Qualitätsmanagement	76
2.1.1.75	Qualitätsmanagement	77
2.1.1.76	Qualitätsmanagement	78
2.1.1.77	Qualitätsmanagement	79
2.1.1.78	Qualitätsmanagement	80
2.1.1.79	Qualitätsmanagement	81
2.1.1.80	Qualitätsmanagement	82
2.1.1.81	Qualitätsmanagement	83
2.1.1.82	Qualitätsmanagement	84
2.1.1.83	Qualitätsmanagement	85
2.1.1.84	Qualitätsmanagement	86
2.1.1.85	Qualitätsmanagement	87
2.1.1.86	Qualitätsmanagement	88
2.1.1.87	Qualitätsmanagement	89
2.1.1.88	Qualitätsmanagement	90
2.1.1.89	Qualitätsmanagement	91
2.1.1.90	Qualitätsmanagement	92
2.1.1.91	Qualitätsmanagement	93
2.1.1.92	Qualitätsmanagement	94
2.1.1.93	Qualitätsmanagement	95
2.1.1.94	Qualitätsmanagement	96
2.1.1.95	Qualitätsmanagement	97
2.1.1.96	Qualitätsmanagement	98
2.1.1.97	Qualitätsmanagement	99
2.1.1.98	Qualitätsmanagement	100
2.1.1.99	Qualitätsmanagement	101
2.1.1.100	Qualitätsmanagement	102

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	<u>EINLEITUNG</u>	1
2.	<u>BESTIMMUNGSMETHODEN VON C-AMP</u>	4
2.1.	Bestimmungsmethoden mit Hilfe des Phosphorylasesystems	5
2.1.1.	Methode nach T.W.RALL und E.W.SUTHERLAND	5
2.1.1.1.	Prinzip	5
2.1.1.2.	Sensitivität	6
2.1.1.3.	Spezifität	6
2.1.2.	Methode nach E.BROWN et al.	6
2.1.2.1.	Prinzip	6
2.1.2.2.	Sensitivität	7
2.1.2.3.	Spezifität	7
2.1.2.4.	Nachteile der obengenannten Methode	7
2.1.3.	Beurteilung	8
2.2.	Bestimmungsmethoden mit Hilfe einer Phosphodiesterase	8
2.2.1.	Methode nach R.W.BUTCHER und E.W.SUTHERLAND	8
2.2.1.1.	Prinzip	8
2.2.1.2.	Sensitivität	9
2.2.1.3.	Spezifität und Richtigkeit	9
2.2.2.	Methode nach G. BROOKER	9
2.2.2.1.	Prinzip	9
2.2.2.2.	Sensitivität	10
2.2.2.3.	Spezifität und Richtigkeit	10
2.2.3.	Methode nach B.McL.BRECKENRIDGE	10
2.2.3.1.	Prinzip	10
2.2.3.2.	Sensitivität	11
2.2.3.3.	Spezifität und Richtigkeit	12
2.2.4.	Von B.McL.BRECKENRIDGE abweichende Methoden	12
2.2.4.1.	Prinzip von G.D.AURBACH und B.A.HOUSTON	12

2.2.4.1.1.	Sensitivität	12
2.2.4.2.	Prinzip von T.KANEKO und J.B.FIELD	13
2.2.4.2.1.	Sensitivität	13
2.2.4.3.	Prinzip von R.A.JOHNSON und M.S.EBADI	13
2.2.4.3.1.	Sensitivität	13
2.2.5.	Methode nach J.R.TURTLE und D.M.KIPNIS	14
2.2.5.1.	Prinzip	14
2.2.5.2.	Sensitivität	14
2.2.6.	Beurteilung	14
2.3.	Methoden, die an eine Chromato- graphie gebunden sind	15
2.3.1.	Methode nach G.BROOKER	15
2.3.1.1.	Prinzip	15
2.3.1.2.	Sensitivität	15
2.3.1.3.	Beurteilung	15
2.3.2.	Methode nach G.L.PAUK und W.J.REDDY	15
2.3.2.1.	Prinzip	15
2.3.2.2.	Sensitivität	16
2.3.2.3.	Spezifität und Richtigkeit	16
2.4.	Radioimmunoassay	16
2.4.1.	Methode nach A.L.STEINER	16
2.4.1.1.	Prinzip	16
2.4.1.2.	Sensitivität	17
2.4.1.3.	Spezifität und Richtigkeit	17
2.4.1.4.	Beurteilung	17
2.5.	Bestimmungsmethoden mit Hilfe nukleotidabhängiger Proteinkinasen	18
2.5.1.	Bestimmungsmethoden, die c-AMP über die Steigerung der Phosphory- lierungsrate messen	18
2.5.1.1.	Prinzip	18
2.5.1.2.	Sensitivität	19

	Seite
2.5.1.3.	Spezifität und Richtigkeit 19
2.5.1.4.	Beurteilung 19
2.5.2.	Bestimmungsmethoden im Sinne eines Isotopenverdünningstestes 20
2.5.2.1.	Prinzip 20
2.5.2.2.	Sensitivität 20
2.5.2.3.	Spezifität 21
2.5.2.4.	Beurteilung 21
2.6.	Überblick 22
3.	<u>METHODIK DER c-AMP-BESTIMMUNG</u>
	<u>IM URIN</u> 23
3.1.	Präparation c-AMP-bindenden Proteins 23
3.1.1.	Zubehör 23
3.1.2.	Vorbereiten der Säulen 24
3.1.3.	Homogenisieren von Rinderschulter 24
3.1.4.	Trennung 26
3.1.5.	Ausbeute 30
3.1.6.	Proteincharakteristika 31
3.1.7.	Bindungskinetik 31
3.2.	Versuchsdurchführung 32
3.2.1.	Zubehör 32
3.2.2.	Herstellung der Lösungen 32
3.2.2.1.	Halbbarkeit der Lösungen 33
3.2.3.	Zubereitung der Proben 33
3.2.4.	Pipettierschema 33
3.2.5.	Auswertung 36
3.3.	Überprüfen der Verlässlichkeit der Methode 37
3.3.1.	Bestimmung bei verschiedenen Verdünnungen 37
3.3.2.	Präzision in der Serie 38
3.3.3.	Wiederfinderversuch 38
3.4.	Beständigkeit der Proben 38
3.4.1.	Beständigkeit der Proben bei Zimmertemperatur 38

3.4.2.	Beständigkeit bei mehrmaligem Auftauen	39
3.5.	Bestimmung von c-AMP im 24-Stunden-Urin	39
3.5.1.	Tagesrhythmik	39
3.5.2.	Normalkollektiv	41
3.5.2.1.	Normalkollektiv in $\mu\text{Mol}/24\text{h}$	41
3.5.2.2.	Normalkollektiv in $\mu\text{Mol}/\text{g-Kreatinin}$	41
3.5.2.3.	Normalkollektiv in $\mu\text{Mol}/100\text{ ml/min}$ Kreatinin-Clearance	42
3.5.2.4.	Beurteilung	42
3.5.3.	Patientenkollektiv	42
3.5.3.1.	Patienten mit primärem Hyperparathyreoidismus	42
3.5.3.2.	Patienten mit vermutetem Hyperparathyreoidismus	43
3.5.3.3.	Vergleich der c-AMP-Ergebnisse mit anderen diagnostischen Methoden	44
3.5.3.4.	Patienten mit nicht PTH-bedingten ossären Erkrankungen	47
3.5.3.5.	Malignom-Patienten mit Hyperkalziämie	47
3.5.3.6.	Beurteilung	47
3.5.4.	Prä- und postoperative c-AMP-Bestimmung bei einem Patienten mit primärem Hyperparathyreoidismus	52
3.5.5.	c-AMP-Bestimmung im Urin, vor und nach Kalzium-Suppression	54
3.5.6.	c-AMP-Bestimmung im Urin bei einer Patientin mit Pseudohypoparathyreoidismus, vor und nach Parathormongabe	55
3.5.6.1.	Versuchsdurchführung	56
3.5.6.2.	Versuchsergebnisse	57
3.5.6.3.	Beurteilung	60
<u>4.</u>	<u>DISKUSSION</u>	62
<u>5.</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u> deutsch und englisch	74
<u>6.</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	81

LISTE DER ABKÜRZUNGEN

Ado-3':5'-MP, c-AMP	= cyclisches Adenosinmono- phosphat
c-GMP	= cyclisches Guanosinmono- phosphat
AMP, ADP, ATP	= Adenosinmono-, di-, tri- phosphat
GDP, GTP	= Guanosindi-, triphosphat
CDP, CTP	= Cytidindi-, triphosphat
UTP	= Uridintriphosphat
ThDP, ThTP	= Thymidindiphosphat, -tri- phosphat
CoA	= Coenzym A
FAD	= Flavinadenindinukleotid
NAD, NADH/H ⁺	= Nicotinamidadenindinukleotid bzw. reduziert
NADP, NADPH/H ⁺	= Nicotinamidadenindinukleotid- phosphat bzw. reduziert
TLC	= Thin-layer-chromatography
TCA	= Tri-Chlor-Essigsäure
MG	= Molekulargewicht
³ H	= Tritium
PTH	= Parathormon
pHPT	= primärer Hyperparathyreoidismus
EDTA	= Äthylendiamintetraessigsäure
μ	= mikro (1 x 10 ⁻⁶)
$\bar{x}$	= Mittelwert
N	= Anzahl
S.D., s	= Standardabweichung
S.E.	= standard error

LISTE DER PRÄPARATE

Sephadex G-25 fine (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
Whatman-Cellulose DE 52 (Whatman Biochemicals Ltd.,
Maidstone, England), Cat.No.6901
Radioisotopenverdünnungstest (Bestellnr. 15289, Firma
Boehringer, Mannheim, Deutschland)
Adenosin-3:5'-monophosphorsäure, cyclisch (Bestellnr.15076,
Firma Boehringer, Mannheim)
Parathormon (P-20) (Bestellnr. 355, Firma Eli Lilly,
Indianapolis, U.S.A.)
Millipore-Filter HAWP 025 OO, HA 0.45 μ (Firma Millipore GmbH,
6078 Neu-Isenburg, Deutschland)
 ^3H -c-AMP 38.4 Ci/mMol (Bestellnr. NET-275, Firma New England
Nuclear, 6072 Dreieichenhain, Deutschland)

Alle übrigen benutzten Präparate waren p.a.-Präparate der
Merck AG., Darmstadt.

LISTE DER GERÄTE

Kühlzentrifuge MSE High-Speed 18 (Fa. MSE Ltd., London, England)
Magnetmixer (Fa.Heidolph-Elektro KG., 8420 Kelheim)
Eppendorf-Zentrifuge und Mikropipetten (Fa.Eppendorf Gerätebau,
Netheler & Hinz GmbH, Hamburg)
Schlauchpumpe (Fa. Ismatec, Zürich, Schweiz)
Pumpenschläuche (Technicon Instruments Corp., Chauncey,
New York, U.S.A.)
Fraktionskollektor Linear II, UV-Monitor und Schreiber
Fa. SERVA, Freiburg)
Filtriergerät (Fa. H.Hölzel, 825 Dorfen)
Zählgerät Modell 3324, Tri-Carb Liquid Scintillation
Spectrometer System (Fa.Packard, Illinois, U.S.A.)

1. EINLEITUNG

Es gibt immer noch Hormone, die sich mit Hilfe radioimmunologischer Methoden nur in wenigen medizinischen Zentren bestimmen lassen. Eines davon ist das Parathormon. Die Ursache dafür liegt unter anderem in der Eigenschaft der zur Verfügung stehenden Antikörper, vorhandene Bruchstücke dieser Hormone, die keine biologische Aktivität aufweisen, mit zu erfassen. Bei der Diagnose von Erkrankungen der Nebenschilddrüse, insbesondere des Hyperparathyreoidismus, ist man deshalb in der Regel noch auf indirekte Parameter angewiesen. Die Methode der Wahl ist die Bestimmung der renalen Phosphatausscheidung vor und nach Calciumsuppression nach L.H.KYLE et al. (30). Da es aber auch hiermit nicht immer möglich ist, pathologische von normalen Fällen zu trennen, ist man bestrebt, andere Möglichkeiten zu finden, die Rückschlüsse auf den Parathormongehalt des Serums zulassen. Eine davon ist die Messung von cyclischem Adenosinmonophosphat im Urin.

Um diesen Zusammenhang zwischen Parathormon und cyclischem Adenosinmonophosphat zu erkennen, ist es wesentlich, sich die Wirkungsweise des Nukleotids als "second messenger" (56) vor Augen zu führen (Abb. 1).

1958 konnten EARL W. SUTHERLAND und T.W.RALL (43) nachweisen, daß die vermehrte Bildung von Phosphorylase, die man nach Zugabe von Adrenalin oder Glukagon in Leberhomogenaten beobachten kann, durch einen "hitzestabilen Faktor" induziert wird, dessen Struktur als Adenosin-3':5'-Monophosphat bestimmt worden ist (34). Dieses Molekül übermittelt die Information des Hormons, des ersten Sendboten also, auf das Erfolgsorgan. Auf Grund dieser Eigenschaft wird das Adenosin-3':5'-Monophosphat auch als "second messenger" bezeichnet, wobei folgender Mechanismus für eine Vielzahl von Hormonen, auch für das Parathormon, als im Prinzip gültig angesehen wird.

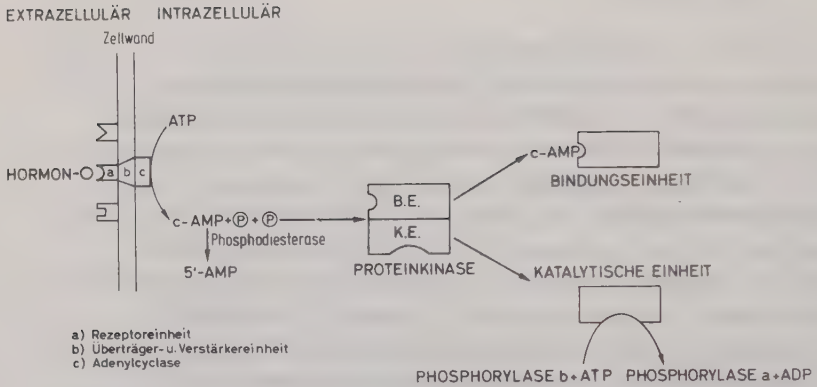


Abb. 1: Schematische Darstellung der Wirkungsweise von cyclischem Adenosinmonophosphat am Beispiel des Glykogenabbaus (modifiziert n.K.D.GERBİTZ (22))

Das jeweilige Hormon wird an der Zelle von einem spezifischen "Rezeptor" aufgenommen. Das Signal, das es beinhaltet, wird über ein membranständiges Transportsystem an eine "Adenylcyclase" weitergeleitet, von der P.R.DAVOREN (16) zeigen konnte, daß auch sie an die Zellmembran gebunden ist. Dieses Enzym, besser Enzymsystem (7), bewirkt die Dephosphorylierung von Adenosintriphosphat zu Adenosin-3':5'-Monophosphat, kurz Ado-3':5'-MP oder c-AMP genannt.

Steigt innerhalb der Zelle die Konzentration des Nukleotids an, kommt es zur Dissoziation einer c-AMP-abhängigen Proteinkinase. Dieses Enzym, das sich zu 90 % im Cytosol der Zelle befindet (7), zerfällt in eine Regulator- oder Katalytische und eine Bindungseinheit. Während die Katalytische Einheit die eigentliche Phosphorylierungsreaktion am "Erfolgsprotein", zum Beispiel Phosphorylase (s.Abb.1) in Gang bringt, bindet

der andere Teil des Holoenzym spezifisch das c-AMP. Sowohl diese Bindung als auch die Aktivität der Katalytischen Einheit werden auf noch nicht bekannte Weise durch ein bis zu 96° hitzestabiles "Modulatorprotein" mit einem Molekulargewicht von 26 000 beeinflusst (61).

Trotz des sofortigen Abbaus von überschüssigem c-AMP mit Hilfe einer Phosphodiesterase geraten kleine Mengen des Nukleotids in das Plasma.

P.R.DAVOREN und E.W.SUTHERLAND diskutierten einen aktiven Transport des Moleküls entgegen einen Konzentrationsgradienten, wie sie ihn in Taubenerythrozyten fanden (15). Die Ausscheidung des im Plasma befindlichen c-AMP erfolgt über die Niere. Das im Urin vorhandene, gegenüber dem Plasma etwa hundertfach konzentrierte c-AMP (48) entstammt bei Normalpersonen zu etwa zwei Drittel glomerulärer Filtration (26). Das restliche Drittel kommt durch aktive Sekretion der Niere zustande. L.R.CHASE und G.D.AURBACH (13) konnten an parathyroidektomierten Ratten nachweisen, daß dieser Anteil nach Gabe von Parathormon ansteigt. N.I.KAMINSKY et al. (26) zeigten an Normalpersonen, denen man Parathormon applizierte, daß der renal sezernierte Anteil des im Urin vorhandenen c-AMP bis zu 94 % betragen kann. Dies ist Folge der Wirkung einer in den proximalen Nierentubuli lokalisierten, Parathormon-sensitiven Adenylcyclase (11, 15, 38, 43).

Die Parathormon-abhängige c-AMP-Ausscheidung wurde von verschiedenen Autoren genutzt, um Mangel oder Überschuß an Parathormon im menschlichen Plasma zu diagnostizieren.

Es sollte Ziel dieser Arbeit sein, die derzeit vorhandenen Bestimmungsmethoden für c-AMP kritisch zusammenfassend darzustellen, sowie die diagnostische Verwertbarkeit der c-AMP-Bestimmung im Urin, auch anhand eigener Fälle, zu überprüfen.

2. BESTIMMUNGSMETHODEN CYCLISCHEN ADENOSIN- MONOPHOSPHATS

Die Erprobung des einfachen Schlusses, je mehr c-AMP im Urin, desto mehr Parathormon im Plasma, ist zunächst durch die sehr schwierige Bestimmung des Nukleotids limitiert gewesen, dessen Konzentration sich im mikro- bis nanomolaren Bereich pro Liter bewegt. Diese geringe Konzentration ist Folge des sehr gut funktionierenden intrazellulären Regelmechanismus:

T.W.RALL und E.W.SUTHERLAND (43) haben bei ihren Experimenten ein zellständiges Enzym gefunden, das in der Lage ist, c-AMP zu inaktivieren. Es handelt sich dabei um eine Phosphodiesterase (s.Einleitung), deren Aktivität an die Gegenwart von Magnesiumionen gebunden ist. B.BUTCHER (11) hat den Wirkungsmechanismus dieses Enzyms untersucht. Er hat zeigen können, daß es die Hydrolyse des Ado-3':5'-MP an der 3'-Position katalysiert, wobei Adenosinmonophosphat entsteht. Dadurch kann man annehmen, daß die Konzentration von c-AMP in den Geweben ein Resultat zweier einander entgegengesetzter Prozesse ist: Synthese von c-AMP auf der einen und Abbau durch die Phosphodiesterase auf der anderen Seite.

Verstärkte oder verminderte Bindung des c-AMP an die Proteinkinase (s.Einleitung) ist ein weiterer Faktor, der die Konzentration beeinflusst.

Dieses gut funktionierende Fließgleichgewicht führt zu einer relativ geringen Konzentration des cyclischen Nukleotids gegenüber anderen Nukleotiden. Daraus werden die hohen Anforderungen an eine Bestimmungsmethode von cyclischem Adenosinmonophosphat ersichtlich: Große Sensitivität und hohe Spezifität. Es gibt inzwischen ein gutes Dutzend von Bestimmungsmethoden, denen folgende Prinzipien zugrunde liegen:

- 1) Aktivierung des Phosphorylasesystems mit Hilfe des cyclischen Nukleotids und darauffolgende

Bestimmung anfallender Metabolite.

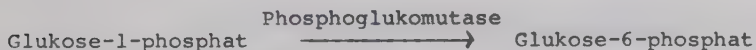
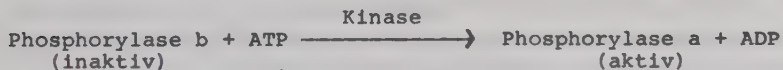
- 2) Abbau des c-AMP mit Hilfe einer Phosphodiesterase und Bestimmung des zuletzt anfallenden Nukleotids.
- 3) Methoden, die an eine Chromatographie gebunden sind.
- 4) Radioimmunoassay
- 5) Bestimmungsmethoden mit Hilfe Nukleotid-abhängiger Proteinkinasen.

2.1. Bestimmungsmethoden mit Hilfe des Phosphorylasesystems

2.1.1. Methode nach T.W. RALL und E.W.SUTHERLAND

2.1.1.1. Prinzip

Die 1958 von T.W. RALL und E.W. SUTHERLAND (43) entwickelte Methode ist mehrere Jahre Methode der Wahl gewesen. Sie beruht auf der Fähigkeit des c-AMP, über eine Proteinkinase die Bildung von aktiver Phosphorylase in Leberhomogenaten zu stimulieren. Die Reaktion ist folgende:



Auf Grund der Zugabe von c-AMP ergibt sich eine vermehrte Bildung von aktiver Leberphosphorylase. Die Größe dieser Aktivierung wird mit Hilfe der Fähigkeit dieses Enzyms ge-

messen, aus Glykogen Glukose-1-phosphat freizusetzen, das schließlich über Glukose-6-phosphat zu Glukose und Phosphat abgebaut wird. Das Phosphat, das innerhalb von 5 Minuten freigesetzt wird, bestimmt man mit Hilfe eines geeigneten Colorimeters nach der Methode von C.H.FISKE und Y.SUBBAROW (21).

2.1.1.2. Sensitivität

Die Meßbreite der Methode liegt zwischen

0.8×10^{-7} und 2.0×10^{-7} Mol/l (43).

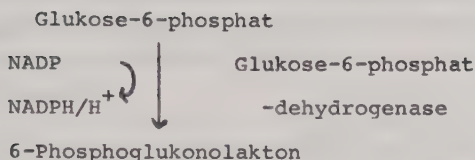
2.1.1.3. Spezifität

Die Spezifität des Assays ist sicherlich nicht genügend ausgetestet worden. Als inaktiv haben sich Muskel-AMP, Adenosin-2':3'-monophosphat, ADP und ATP erwiesen. Als einzige unter den untersuchten Substanzen verhielt sich Trypsin wie c-AMP. In Konzentrationen von 0.1 - 1.0 µg/ml erfolgt auf die Zugabe von Trypsin ein linearer Anstieg der Phosphorylase-Aktivierung. Oberhalb einer Konzentration von 1.0 µg/ml kommt es dagegen zu einem massiven Hemmeffekt. Die Wirkung des Trypsins auf die c-AMP Funktion in diesem System ist nicht weiter untersucht worden (43).

2.1.2. Methode nach E. BROWN et al.

2.1.2.1. Prinzip

Die Methode von T.W. RALL und E.W. SUTHERLAND ist von E. BROWN et al. (9) dahingehend modifiziert worden, daß sie dieselbe Anfangsreaktion mit einer NADP-Reduktion gekoppelt haben:



Aus dem Versuchsaufbau ergibt sich, daß die Menge an produziertem NADPH/H^+ der anfangs vorhandenen Menge an c-AMP direkt proportional ist. Der NADPH/H^+ -Gehalt der Lösung wird mit Hilfe eines Aminco-Bowman-Spectrofluorometers gemessen.

2.1.2.2. Sensitivität

Mit Hilfe dieses Systems konnten Ado-3':5'-MP-Konzentrationen bis hinunter zu

$$1 \times 10^{-6} \text{ Mol/l}$$

gemessen werden (50).

2.1.2.3. Spezifität

Artefakte innerhalb des Systems können nicht ausgeschlossen werden, wie Experimente anderer Gruppen gezeigt haben (3, 42).

2.1.2.4. Nachteile der obengenannten Bestimmungsmethode

Es hat sich herausgestellt, daß der gewonnene Leberextrakt nur 10 - 12 $\mu\text{Mol/ml}$ an NADP enthält. Um zufriedenstellende Meßergebnisse zu erhalten, benötigt man jedoch eine Konzentration von 200 $\mu\text{Mol/ml}$. Aus diesem Grund wird noch exogenes NADP hinzugegeben, das jedoch, genau wie das endogene NADP, von anderen Systemen, die sich im Assay-Ansatz befinden, verbraucht beziehungsweise zerstört wird. N.S. SCOTT und I.R. FALCONER (50) umgehen diese Schwierigkeiten, indem

sie die Gewebspräparation dialysieren, um die endogenen Substrate für NADP-Oxidoreduktasen zu entfernen. Dadurch ist man mit dieser Methode in der Lage, c-AMP bereits in Konzentrationen von

$$1 \times 10^{-8} \text{ Mol/l}$$

zu bestimmen.

2.1.3. Beurteilung

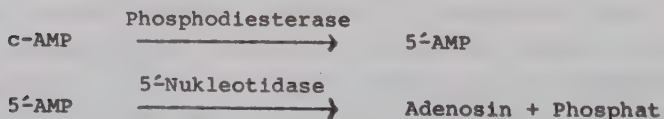
Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die ersten Nachweismethoden des c-AMP, die sich auf die Aktivierung einer Phosphorylase stützen, alles andere als ideal sind, wenn man sie vom Standpunkt der Standardisierung, Sensitivität und Spezifität betrachtet.

2.2. Bestimmungsmethoden mit Hilfe einer Phosphodiesterase

2.2.1. Methode nach R.W. BUTCHER und E.W. SUTHERLAND (11)

Sie beruht letzten Endes auch auf der Messung von Phosphat nach der Methode von FISKE und SUBBAROW (21). Ein neuer Aspekt ergibt sich jedoch durch die Verwendung einer Phosphodiesterase und einer 5'-Nukleotidase.

2.2.1.1. Prinzip



c-AMP wird mit einer Phosphodiesterase inkubiert und zu 5'-AMP hydrolysiert. Das so entstandene Monophosphonukleotid wird mit Hilfe einer 5'-Nukleotidase, die aus "Crotalus atrox"-

Schlangengift gewonnen wird, zu Adenosin und Phosphat abgebaut.

2.2.1.2. Sensitivität

Die Sensitivität des Assays liegt im Bereich der bereits beschriebenen Methoden.

2.2.1.3. Spezifität und Richtigkeit

Wenn auch die große chemische Stabilität des c-AMP eine große Hilfe bei den Messungen ist, ergeben sich doch verschiedene Probleme bei der Anwendung der Methode: Die erforderliche Präparation der Enzyme ist schwierig, ihre Spezifität nicht genügend getestet. Verunreinigungen innerhalb des Systems können nicht ausgeschlossen werden. Unter bestimmten Voraussetzungen erweisen sich Ca^{++} -Ionen als Aktivatoren, Glukose-6-phosphat und ADP als Hemmer der Gesamtreaktion (11).

2.2.2. Methode nach G.BROOKER (25)

2.2.2.1. Prinzip

Die Methode von G. BROOKER beruht im Prinzip auf den Anfangsreaktionen (s. 2.2.1.1.) des Assays von R.W. BUTCHER und E.W. SUTHERLAND (11). Neu ist die Überlegung, daß die Größe der Umbaurate von hinzugefügtem ^3H -c-AMP von der Menge des endogenen c-AMP abhängig ist, wobei die Reaktion zu einem bestimmten Zeitpunkt gestoppt wird. Die Größe der Veränderung des Quotienten P'/P'_0 , (d.h. radioaktives Produkt P' in Gegenwart von radioaktivem Substrat S' und nicht radioaktivem Substrat S im Verhältnis zum radioaktiven Produkt P'_0 in Gegenwart von radioaktivem Substrat S' allein) ist eine Funktion der Konzentration des radioaktiven Substrats S' und der Michaeliskonstante (k_m) des benutzten Enzyms. Die folgende Formel von G. BROOKER erläutert diese Beziehung:

$$\frac{P'}{P'_O} = \frac{k_m + S'}{k_m + S' + S}$$

Die Reaktion wird durch Hinzufügen von einem Anionenaustauscher gestoppt, der das nicht reagierende ^3H -AMP bindet, während das entstandene ^3H -Adenosin nicht gebunden wird. Das ^3H -Adenosin wird mit Hilfe eines Szintillationsmeßgerätes gemessen und aus dem Zählergebnis die c-AMP-Menge anhand von Eichkurven bestimmt.

2.2.2.2. Sensitivität

Die untere Nachweisgrenze liegt im Bereich von

$$1 \times 10^{-7} \text{ Mol/l.}$$

2.2.2.3. Spezifität und Richtigkeit

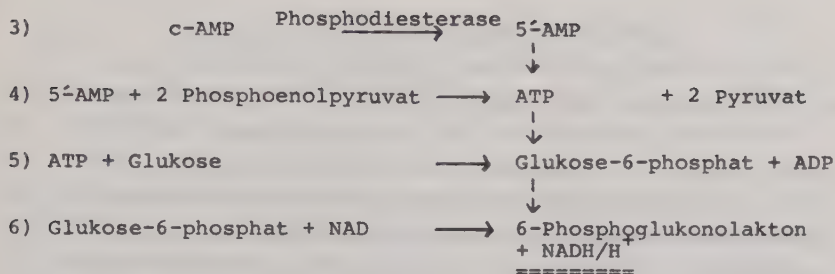
Die Spezifität und Richtigkeit entsprechen derjenigen der Methode von R.W. BUTCHER und E.W. SUTHERLAND (s. 2.2.1.3.).

2.2.3. Methode nach B.McL. BRECKENRIDGE (3)

2.2.3.1. Prinzip

Das Prinzip der Methode sei kurz aufgezeigt:

- 1) Zerstören unerwünschter Adenylate durch Apyrase und Phosphatase.
- 2) Zerstören der Phosphatase durch Pepsin.



Anmerkung: - - - - $\rightarrow$ Der für das Verständnis der Methode entscheidende Reaktionsweg.

Nachdem c-AMP mit Hilfe der spezifischen Phosphodiesterase zu 5'-AMP abgebaut ist, wird dieses in stöchiometrischen Mengen mit Hilfe einer Pyruvat-Kinase zu ATP phosphoryliert. Nach Zugabe von Glukose entsteht Glukose-6-phosphat und zwar in einer Menge, die der anfänglichen c-AMP-Konzentration proportional ist. Das entstehende NADH/H^+ wird spektrofluorometrisch bestimmt.

2.2.3.2. Sensitivität

Die Sensitivität der Methode, definiert als die Konzentration an c-AMP, die benötigt wird, um einen absoluten Fluoreszenzwert zu bekommen, der doppelt so hoch ist wie der Leerwert, beträgt

$$1.7 \times 10^{-8} \text{ Mol/l.}$$

Verfeinerungen des Systems, die durch N.D. GOLDBERG (24) vorgenommen worden sind, erlauben Messungen von c-AMP-Konzentrationen bis hinab auf

$$5.0 \times 10^{-14} \text{ Mol/l.}$$

Die Unterschiede gegenüber der Methode von B.McL.BRECKENRIDGE liegen vor allem in der effektvolleren Entfernung störender Substanzen. Dabei wird das c-AMP mit Hilfe einer Dünnschichtchromatographie (TLC) von Nukleosid-5'-mono-, di- und triphosphaten getrennt.

2.2.3.3. Spezifität und Richtigkeit

Die potentielle Beeinflussung durch eine Auswahl von Nukleotiden wurde ausreichend kontrolliert. Untersucht wurden die Einflüsse von ATP, Kreatinphosphat, GTP, UTP, NAD, NADP, CoA, FAD allein und in Kombination mit $2':5'$ -ADP und $3':5'$ -ADP. Der Wert des c-AMP-Äquivalents für die oben angegebenen Bestandteile beträgt weniger als 5% der c-AMP-Menge, die man normalerweise mit Hilfe des Assays findet.

Zerstört man endogen vorhandenes c-AMP vor Beginn der Versuchsdurchführung durch Inkubation mit Phosphodiesterase, so ergeben sich in den ersten Schritten dieses Assays keine c-AMP-imitierenden Artefakte. Die Wiederfindewerte liegen zwischen 84 und 95 %.

2.2.4. Von B.McL.BRECKENRIDGE abweichende Methoden

Es gibt eine Reihe von Bestimmungsmethoden, die sich alle die Anfangsreaktionen der Methode von B.McL.BRECKENRIDGE zunutze machen und diese lediglich mit einer jeweils anderen Nachweismethode für das anfallende ATP kombinieren.

2.2.4.1. Prinzip von G.D.AURBACH und B.A.HOUSTON (2)



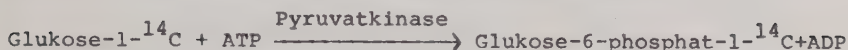
Das Ergebnis der Reaktion wird gemessen und zur c-AMP-Menge in der Ausgangsprobe linear in Bezug gesetzt.

2.2.4.1.1. Sensitivität

Die untere Nachweisgrenze liegt bei etwa

$$6.0 \times 10^{-12} \text{ Mol/l.}$$

2.2.4.2. Prinzip von T.KANEKO und J.B.FIELD (27)



Die Menge an gebildetem Glukose-6-phosphat-1- ^{14}C ist proportional dem ATP-Gehalt der Mischung. In Gegenwart von im Überschuß vorhandener Glukose-6-phosphat-dehydrogenase, 6-Phosphoglukonolaktondehydrogenase und NAD entsteht $^{14}\text{CO}_2$, das gemessen und gegen die c-AMP-Konzentration aufgetragen wird.

2.2.4.2.1. Sensitivität

Die untere Nachweisgrenze liegt bei etwa

$$1.0 \times 10^{-12} \text{ Mol/l.}$$

2.2.4.3. Prinzip von R.A.JOHNSON (25) und M.S.EBADI (19)

Eine andere Möglichkeit des ATP-Nachweises ist die "Luciferase Methode" von R.A. JOHNSON und M.S. EBADI. Dabei reagiert Luciferin (LH_2) mit ATP. Es entsteht neben Pyrophosphat ein enzymgebundenes Luciferyl-Adenylat (Enzym- LH_2 -AMP), das bei seiner Oxidation zu einer Lichtemission führt. Diese wird mit Hilfe eines Lumineszenzbiometers gemessen.

Reaktionsschema:



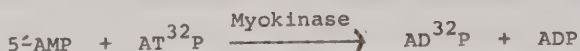
2.2.4.3.1. Sensitivität

Die untere Nachweisgrenze beträgt etwa

$$1.0 \times 10^{-10} \text{ Mol/l.}$$

2.2.5. Methode nach J.R.TURTLE und D.M.KIPNIS (59)

2.2.5.1. Prinzip



Das in der Probe vorhandene c-AMP wird zunächst durch Dünnschichtchromatographie (TLC) von anderen Nukleotiden getrennt und mit Hilfe einer Phosphodiesterase zu 5'-AMP hydrolysiert.

In Gegenwart von ^{32}P -Adenosintriphosphat und Myokinase wird das vorhandene 5'-AMP zu ^{32}P -Adenosindiphosphat. Dies wird mit Hilfe der TLC separiert und gezählt.

2.2.5.2. Sensitivität

Die Sensitivität dieser Methode ist etwas besser als die der Methode von B.McL. BRECKENRIDGE.

2.2.6. Beurteilung

Jede Methode, die auf dem c-AMP-Abbau durch Phosphodiesterase basiert und oben aufgeführt ist, ist in der Lage, c-AMP verlässlich nachzuweisen. Die Spezifität der Methoden ist groß. Die Sensitivität ist zufriedenstellend und eigentlich nur durch die Verunreinigung der Nachweisenzyme mit Adeninnukleotiden limitiert.

Jeder dieser Assays erfordert jedoch eine quantitative Trennung des c-AMP von anderen Nukleotiden, die sich als schwierig und nicht immer ausreichend erweist. Die Zeit, die man dazu braucht, und die schwierige Handhabung der Enzyme schränken die Anwendbarkeit dieser Methoden ein.

2.3. Methoden, die an eine Chromatographie gebunden sind

2.3.1. Methode nach G. BROOKER (5)

Die von G.BROOKER entwickelte Methode zur Bestimmung von c-AMP nach Hochdruck-Anionen-Austauscher-Chromatographie möchte ich nur am Rande erwähnen.

2.3.1.1. Prinzip

Durch diese "Hochdruck-Anionen-Austauscher-Chromatographie" wird c-AMP von anderen Nukleotiden abgetrennt, in einem kleinen Volumen eluiert und anschließend bei einer Wellenlänge von 254 nm spektrometrisch bestimmt.

2.3.1.2. Sensitivität

Es ist wahrscheinlich, daß weitere Verfeinerungen des Systems, Messungen bis zu einer minimalen Konzentration von

$$1 \times 10^{-8} \text{ Mol/l}$$

zulassen.

2.3.1.3. Beurteilung

Die entscheidenden Vorteile liegen darin, daß der Nachweis von cyclischem Nukleotid auch dann gelingt, wenn nur sehr geringe Mengen der Probe zur Verfügung stehen. Die Dauer der Versuchsdurchführung ist sehr gering. Eine Bestimmung nimmt weniger als acht Minuten in Anspruch.

Als nachteilig erweist sich die Tatsache, daß ein Mitchromatographieren anderer biologischer Materialien nicht ausgeschlossen werden kann. Dies und die äußerst hohen Kosten für das Bestimmungsgerät haben die Anwendung dieser Methode in der Praxis eingeschränkt.

2.3.2. Methode nach G.L.PAUK und W.J.REDDY (41)

2.3.2.1. Prinzip

Das c-AMP wird mit einem Überschuß mit Tritium markierten Essigsäureanhydrid verestert. Anschließend wird zur Abtrennung des

entstandenen, Tritium-markierten c-AMP-Acetat eine Anionen-austauschersäule verwendet. Diese Chromatographie macht sich die erhöhte Mobilität des Ado-3:5-MP-2-Acetats zunutze, um es von nicht gebundenen, ebenfalls Tritium-markierten Essigsäureresten zu trennen.

2.3.2.2. Sensitivität

Die untere Nachweisgrenze liegt bei etwa

$$5 \times 10^{-7} \text{ Mol/l.}$$

2.3.2.3. Spezifität und Richtigkeit

Die Spezifität der Methode ist groß. Wiederfinderversuche und wiederholte Analyse gleicher Gewebeproben führen zu guten Ergebnissen. Zur Kontrolle ist als interner Standard ein ^{14}C -markiertes c-AMP mitgelaufen.

2.4. Radioimmunoassay

2.4.1. Methode nach A.L.STEINER (51-53)

2.4.1.1. Prinzip

Der von A.L.STEINER beschriebene, hochsensitive Radioimmunoassay für c-AMP beruht auf der Herstellungsmöglichkeit von c-AMP-Antiseren und entspricht dem Prinzip der Radioimmunoassays, die u.a. zur Bestimmung von Peptidhormonen entwickelt worden sind (68).

c-AMP und markiertes c-AMP-Derivat konkurrieren um die Bindungsstelle eines für c-AMP spezifischen Antikörpers.

Damit c-AMP immunologische Wirksamkeit besitzt, bindet man es an ein hochmolekulares Protein. Um eine möglichst hohe Spezifität des Antikörpers zu erreichen, werden dabei weder der Adeninring, noch die 3:5-Diesterbindung geändert. Man succinyliert das c-AMP

am Sauerstoff in der 2-Position und verbindet die freie Carboxylgruppe dieses Derivats mit dem Protein. Mit dieser c-AMP-Human-Serumalbuminverbindung werden Kaninchen immunisiert.

Als Tracer wird dieses hochspezifische Derivat des c-AMP durch Synthese eines Succinyl-c-AMP-Tyrosinmethylesters (ScAMP-TME) gewonnen, bei dem die Phenolhydroxylgruppe der Tyrosinhälfte mit ^{125}J markiert ist. Freies und antikörpergebundenes ^{125}J -ScAMP-TME werden durch Präzipitation der antikörpergebundenen Fraktion getrennt, die mit Hilfe eines zweiten Antikörpers erfolgt (Anti-Kaninchen-Gammaglobulin der Ziege).

2.4.1.2. Sensitivität

Dieser Assay gestattet Messungen bis hinab auf etwa

$$1 \times 10^{-12} \text{ Mol/l.}$$

2.4.1.3. Spezifität und Richtigkeit

Die Spezifität des Assays ist sehr gut. Strukturell verwandte Nukleotide, Nukleoside und Purinbasen hemmen die ^{125}J -ScAMP-TME-Bindung nur zu 0.005 % des Wertes, der sich für c-AMP findet.

Bei Inkubation von Gewebsextrakten mit einer Phosphodiesterase werden mehr als 90 % des gemessenen Nukleotids zerstört. Die Wiederfinderaten hinzugefügter Mengen an c-AMP sind größer als 90 %.

2.4.1.4. Beurteilung

Die Methode erweist sich dann als wertvoll, wenn c-AMP in einer geringen Anzahl von Zellen bestimmt werden soll.

Die notwendige Antigen- und Antikörperherstellung ist schwierig.

Es ist eine Inkubationszeit von 6 Stunden erforderlich.

2.5. Bestimmungsmethoden mit Hilfe nukleotid-abhängiger Proteinkinasen

Die Auffindung c-AMP-abhängiger Proteinkinasen zuerst in Skelettmuskel (60) und Leber (69), danach in einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe (35, 36, 57) eröffnet eine neue Möglichkeit der c-AMP-Bestimmung. Dabei können prinzipiell zwei Wege eingeschlagen werden (22):

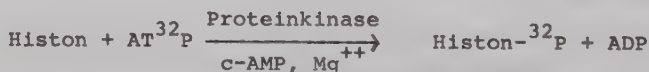
1) Ausnützen der Nukleotideigenschaft, die Phosphorylierungsrate einer Proteinkinase konzentrationsabhängig zu stimulieren.

2) Ausnützen der Bindungsfähigkeit des Nukleotids an die Regulatoreinheit einer Proteinkinase (s. Einleitung) und Konkurrenz mit markiertem c-AMP um die Bindungsstelle im Sinne eines kompetitiven Isotopenverdünnungstests.

2.5.1. Bestimmungsmethoden, die c-AMP über die Steigerung der Phosphorylierungsrate messen

2.5.1.1. Prinzip

Eine Reihe im Grunde gleicher Methoden, die auf der Aktivierung der Kinasereaktion durch das jeweilige Nukleotid beruhen, ist publiziert (6, 10, 12, 28, 29, 31, 63). Prinzip der Methoden ist die Übertragung der markierten (^{32}P) Phosphatgruppe des ATP auf ein Akzeptorprotein, zum Beispiel Histon, Protamin oder Casein, durch eine von der Konzentration an c-AMP abhängigen Proteinkinase:



Das markierte Protein wird durch Zentrifugieren gesammelt, die Radioaktivität gemessen. Die verschiedenen, in der Literatur aufgeführten Methoden unterscheiden sich nur durch die verwendeten Proteinsubstrate und durch die Art und Weise der Proteinkinasepräparation.

2.5.1.2. Sensitivität

Die untere Nachweisgrenze beträgt ca.

$$0.3 \times 10^{-9} \text{ Mol/l.}$$

2.5.1.3. Spezifität und Richtigkeit

Zahlreiche andere Nukleotide sind daraufhin untersucht worden, ob sie entweder die Proteinkinase aktivieren oder Antagonisten in Bezug auf die Wirkung des c-AMP auf das Enzym sind.

ADP und 5'-AMP aktivieren das System nicht, solange man von einer Konzentration ausgeht, die der erwarteten Gewebskonzentration nach der Verdünnung entspricht, also 100 mg Gewebe pro ml TCA. Cyclisches GMP in Konzentrationen, die sicher über den in den Geweben vermuteten liegen, aktiviert weder die Proteinkinase noch hemmt es die Aktivierung durch c-AMP. Die Wiederfinderate beträgt durchschnittlich 93 %.

2.5.1.4. Beurteilung (22)

Obwohl die oben beschriebenen Systeme spezifisch sind, haben sie doch methodische Nachteile:

- 1) ^{32}P -markiertes ATP ist teuer und nicht lange haltbar.
- 2) Neben der notwendigen Proteinkinase muß auch das Substrat (z.B. Histon) selbst präpariert werden, da die kommerziellen Produkte häufig nicht genügend hohe Einbauraten zeigen.
- 3) Limitiert sind die Methoden durch die Tatsache, daß die gereinigten Proteinkinase-Präparationen eine von exogenem c-AMP unabhängige Basisphosphorylierung zeigen, die entweder durch eine c-AMP-unabhängige Kinase oder durch endogen gebundenes c-AMP bedingt ist.

2.5.2. Bestimmungsmethoden im Sinne eines Isotopenverdünnungstestes

Im Jahre 1970 haben G.M. WALTON und L.D. GARREN (62), A.G. GILMAN (23) und B.L. BROWN et al. (8) Methoden zum Nachweis von c-AMP veröffentlicht, die auf der konkurrierenden Bindung von markiertem und nicht markiertem c-AMP an die Regulatoreinheit einer Proteinkinase beruhen.

2.5.2.1. Prinzip (67)

³H-markiertes und unmarkiertes c-AMP konkurrieren um den Rezeptor am Bindungsprotein. Aus den Anteilen von freier zu gebundener Aktivität kann auf die Konzentration des nicht markierten c-AMP geschlossen werden.

Die Ausführung des Versuches gestaltet sich recht einfach. Markiertes und unmarkiertes c-AMP, das sich in Standard oder Probe befindet, werden zusammen mit dem Bindungsprotein inkubiert. Dabei bildet sich ein c-AMP-Proteinkomplex, dessen Radioaktivitätsmenge ein Maß für den c-AMP-Gehalt der Mischung darstellt. Befindet sich viel c-AMP in der Probe, so findet sich wenig gebundene Radioaktivität. Entsprechend hat wenig c-AMP einen hohen gebundenen Radioaktivitätsanteil zur Folge.

Die Trennung des ³H-c-AMP-Proteinkomplexes von freiem ³H-c-AMP erfolgt durch Adsorption an ein Millipore-Filter (62, 23) oder durch Aktivkohle (8). Filter beziehungsweise nicht an Aktivkohle gebundenes Protein werden im Szintillationsmeßgerät gezählt.

2.5.2.2. Sensitivität

Die untere Nachweisgrenze liegt etwa bei

$$75.0-100 \times 10^{-11} \text{ Mol/l.}$$

2.5.2.3. Spezifität

Das Benützen einer c-AMP-spezifischen Proteinkinase gewährt höchste Spezifität. Beeinflußung durch andere Nukleotide, wie GTP, GDP, CTP, CDP, ThTP, ThDP, findet erst in einer Konzentration statt, die das hundert- bis zehntausendfache der zu erwartenden Konzentrationen dieser Nukleotide beträgt (32).

2.5.2.4. Beurteilung

In der unter 2.6. aufgeführten Tabelle 1 sind noch einmal alle Methode-Prinzipien und ihre Variationen aufgeführt, die Sensitivität und Spezifität sind angegeben.

Die Methode nach A.G.GILMAN (23) bietet gegenüber allen anderen Bestimmungsmethoden entscheidende Vorteile:

- 1) Sie ist ausreichend sensitiv. Durch Reinigen des Enzyms kann die Sensitivität des Assays sogar noch vergrößert werden.
- 2) Die Spezifität ist durch das Benutzen eines spezifischen Enzyms gesichert.
- 3) Die Präparation des Enzyms ist relativ leicht und bringt eine genügend große Ausbeute. Das Enzym ist haltbar.
- 4) Das verwendete ^3H -markierte Nukleotid ist relativ billig und haltbar.
- 5) Der Arbeitsaufwand hält sich in Grenzen, die Inkubationszeit von ungefähr 90 min ist erfreulich kurz. Ohne weitere Automatisierungsmaßnahmen können "per Hand" pro 8 bis 10 Stunden ca. 120 Proben bestimmt werden.
- 6) Durch Verändern der Proteinkinase- und ^3H -c-AMP-Konzentrationen kann der Meßbereich beliebig verändert werden.

Auf Grund all dieser Vorteile stellt die Nachweismöglichkeit von c-AMP mit Hilfe des Assays von A.G. GILMAN (23) gegenwärtig die Methode der Wahl dar; selbst der empfindlichere Radioimmunoassay hat zusätzlich keine wesentlichen Vorteile, sondern eher Nachteile (s. 2.4.1.4. und 54).

Tab. 1: 2.6. Überblick

Methode	Autor	Sensitivität (unt. Nachweis- grenze) Mol/l	Spezifität
1) Mit Hilfe des Phosphorylase-Systems	2.1.1. T.W.RALL, E.W.SUTHERLAND (43) 2.1.2. E.BROWN (9)	0.8 x 10 ⁻⁷ 1.0 x 10 ⁻⁶	fraglich gering
2) Mit Hilfe einer Phosphodiesterase	2.2.1. R.W.BUTCHER, E.W.SUTHERLAND (11) 2.2.2. G.BROOKER (4) 2.2.3. B.McL.BRECKENRIDGE (3) 2.2.4.1. G.D.AURBACH, B.A.HOUSTON (2) 2.2.4.2. T.KANEKO, J.B.FIELD (27) 2.2.4.3. R.A.JOHNSON (25), M.S.EBADI (19) 2.2.5. J.R.TURTLE, D.M.KIPNIS (59)	etwa 10 ⁻⁷ 1.0 x 10 ⁻⁷ 1.7 x 10 ⁻⁸ -10 ⁻¹⁴ 6.0 x 10 ⁻¹² 1.0 x 10 ⁻¹² 1.0 x 10 ⁻¹⁰ etwas besser als 2.2.3.	gering gut gut gut gut gut
3) Methoden, die an eine Chromatographie gebunden sind	2.4.1. G. BROOKER (5) 2.4.2. G.L.PAUK, W.J.REDDY (41)	1.0 x 10 ⁻⁸ 5.0 x 10 ⁻⁷	fraglich gut
4) Radioimmunoassay	2.3.1. A.L.STEINER (51, 52, 53)	1.0 x 10 ⁻¹²	sehr gut
5) Mit Hilfe nukleotidabhängiger Proteinkinasen	2.5.1. Z.F.KUO, C.O.BROSTROM, W.B.WASTILA, F.R.BUTCHER, M.CASTAGNA, A.T.LANGAN (6, 10, 12, 28, 29, 31, 63) 2.5.2. G.M.WALTON, L.D.GARREN (62) A.G.GILMAN (23), B.L.BROWN (8)	0.3 x 10 ⁻⁹ 75.0-100x 10 ⁻¹¹	sehr gut sehr gut

3. METHODIK DER c-AMP-BESTIMMUNG IM URIN

Auf Grund der in Punkt 2.5.2.4. aufgeführten Vorteile haben wir uns für die Methode von A.G. GILMAN (23) entschieden, um c-AMP im Urin zu bestimmen. Um dabei den Laboraufwand möglichst klein zu halten, wurde anfangs ein Kit der Firma Boehringer Mannheim benutzt (Bestellnummer 15289). Dieser Pipettiersatz gestattet jedoch nur 25-30 Doppelbestimmungen, was sich hinsichtlich seines hohen Preises von damals (1972/73) DM 129.- als zu unwirtschaftlich erwiesen hat. Hinzu kommt, daß wir auf Grund der erhaltenen Eichkurven gewisse Bedenken hinsichtlich der Haltbarkeit der Testsubstanzen und Reproduzierbarkeit der Meßwerte gehabt haben. Aus diesen Gründen haben wir beschlossen, den anfälligsten und anscheinend auch teuersten Bestandteil des Kits, das c-AMP-bindende Protein (Proteinkinase $\hat{=}$ ATP: protein phosphotransferase, Nr. 2.7.1.37 nach dem "Enzyme commission classification system") selbst herzustellen.

3.1. Präparation c-AMP-bindenden Proteins

Die Darstellung des für den Nachweis von c-AMP benötigten Proteins erfolgt nach der Methode von A.G.GILMAN (23), E.MIYAMOTO (36) und D.A.WALSH (60), die von J.TRABER (Max-Planck-Institut für Biochemie, 8033 Martinsried bei München) mit kleinen Modifikationen angewandt und von uns übernommen worden ist.

3.1.1. Zubehör

Reagentien:

- 1) 4 mM EDTA-Lösung, pH 7.0, (MG 292.25; 4 mM = 1.169 g/l), es werden etwa 800 ml benötigt.
- 2) 1 N Essigsäure, 100 ml
- 3) 1 M K_2HPO_4 / KH_2PO_4 -Puffer pH 7.2; 500 ml
- 4) Ammoniumsulfat; 500 g
- 5) 5 mM K_2HPO_4 / KH_2PO_4 -Puffer pH 7.0; 15 Liter
- 6) 0.1 M K_2HPO_4 / KH_2PO_4 -Puffer pH 7.0; 1 Liter
- 7) 0.3 M K_2HPO_4 / KH_2PO_4 -Puffer pH 7.0; 5 Liter

- 8) Sephadex G-25 fine; 150 g
- 9) DEAE-Cellulose DE 52; 250 g

Geräte:

- 1) Kühlbox, Teller, Schere, Trockeneis
- 2) Fleischwolf, Kühlzentrifuge, Magnetmischer
- 3) pH-Meter, Wasserstrahlpumpe, Waage
- 4) Schlauchpumpe, Schläuche (70 ml/h, gelbe Markierung)
- 5) Fraktionskollektor und UVICORD-Schreiber mit UV-Spektrometer (260 nm)
- 6) Sephadex G-25-Säule (3.8 x 50 cm)
- 7) DEAE-Cellulose Säule (2.7 x 48 cm)
- 8) 4 Stück 0.5 Liter Kolben
- 9) 2 Stück 1.0 Liter Kolben
- 10) 2 Stück 0.5 Liter Bechergläser
- 11) 2 Stück 1.0 Liter Bechergläser
- 12) Spatel

3.1.2. Vorbereiten der Säulen (1. Tag)

150 g Sephadex G-25 fine und 250 g DEAE-Cellulose DE 52 werden 12 Stunden lang bei Zimmertemperatur in 5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0, gequollen. Beides wird ab und zu aufgerührt und die an der Pufferoberfläche schwimmenden Flocken werden mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Anschließend werden die jeweiligen Glassäulen vorsichtig gefüllt, damit sich keine Luftblasen bilden. Beide Säulen werden an die Schläuche angehängt, verschlossen und in den Kühlraum gebracht (+ 4° C). Nur die Sephadex G-25-Säule wird mit Hilfe einer vorgeschalteten Schlauchpumpe über Nacht, mindestens jedoch 15 Stunden lang, mit demselben Puffer äquilibriert.

3.1.3. Homogenisieren von Rinderschulter (2. Tag)

Wir haben uns für Rinderschulter entschieden, da sie anscheinend eine Proteinkinase enthält, die in der Lage ist, c-AMP irreversibel zu binden (32). Die Art und Weise der Präparation,

die unten noch einmal "Kochbuch-artig" aufgeführt ist, beruht auf folgenden Grundlagen:

Das zerhackte (wichtig: nicht gepreßte!) Fleisch wird mit EDTA-Lösung zusammengegeben, um Ca^{++} -Ionen auszufällen, die für die Aktivierung unerwünschter Enzyme, wie Phosphatasen, Esterasen, Diesterasen usw. notwendig sind. Mit Hilfe einer Zentrifugation wird anschließend der Fleischbrei "aufgeschlossen", d.h. Fett, Fascien und andere, nicht muskuläre Bestandteile der Rinderschulter werden abgetrennt. Der verbleibende Überstand wird einer Säurefällung unterworfen, bei der weitere Fremdproteine denaturiert werden. Der nach Zentrifugieren verbleibende Überstand wird mit einer von J. TRABER empirisch gefundenen Ammoniumsulfatmenge zusammengegeben, die exakt eingehalten werden muß. Dadurch wird das Löslichkeitsprodukt verschiedener Proteinkomplexe überschritten, sie fallen aus und werden durch Zentrifugieren vollständig abgetrennt. Der sich ergebende Niederschlag enthält unter anderem c-AMP-bindendes Protein.

Vom möglichst nahegelegenen Schlachthof werden etwa 350 g Rinderschulter besorgt (schlachtfrisch, dampfend), und in einer Kühlbox, die Trockeneis enthält, in den Kühlraum des Labors gebracht. In diesem Raum werden alle folgenden Arbeiten bei einer Temperatur von $+ 4^{\circ}\text{C}$ durchgeführt:

- 1) Das Fleisch, das mager und fascienfrei sein muß, wird mit einer Schere in etwa 1 cm große Stücke geschnitten.
- 2) Fleischstücke in 750 ml vorbereitete EDTA-Lösung, pH 7.0, geben und im Fleischwolf fein zerhacken.
- 3) Homogenat 30 Minuten bei 27000 x g in Kühlzentrifuge zentrifugieren.
- 4) Überstand durch tropfenweise Zugabe von 1 N Essigsäure (2 - 4 ml) auf pH 4.8 bringen.
- 5) 10 Minuten stehen lassen.
- 6) 30 Minuten bei 27000 x g zentrifugieren.

- 7) Überstand mit 1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7.2, auf pH 6.5 bringen (5 - 10 ml). Das Volumen der Lösung beträgt jetzt ungefähr 500 ml.
- 8) Ammoniumsulfat hinzugeben (32.5 g pro 100 ml Lösung).
- 9) 30 Minuten mit Magnetmixer so heftig rühren, daß das hinzugefügte Ammoniumsulfat vollständig vom Gefäßboden aufgewirbelt wird.
- 10) 20 Minuten bei 16000 x g zentrifugieren.
- 11) Käsigen Niederschlag in 5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0, vorsichtig einrühren. Hierbei werden ca. 10 % des Volumens der Ausgangslösung (s. Punkt 7 und 8) eingesetzt.

Die Menge der gewonnenen, leicht gelblichen Lösung beträgt dann also 60 - 70 ml.

3.1.4. Trennung (2. Tag)

Die Darstellung der Proteinkinase, die sich im wiederaufgenommenen Niederschlag befindet, geschieht mit Hilfe von Säulenchromatographie. Zunächst trägt man das Proteingemisch auf eine Sephadex G-25 fine Säule auf. Man eluiert mit 5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0. Dieser Schritt trennt sowohl das während der Fleisch-Homogenisierung zugegebene Ammoniumsulfat als auch andere Salze von der Proteinfraction. Das Abtrennen der Proteinkinase von anderen Enzymen (z.B. c-GMP-bindendes Protein), die sich im Eluat befinden, gelingt mit einer DEAE-Cellulose-Säule, die erst mit 5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0, dann mit 0.1 Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0, gewaschen wird. Die Elution der Proteinkinase erfolgt mit 0.3 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0. Die zuletzt sich anschließende Chromatographie mit der schon einmal benutzten Sephadex G-25 fine Säule dient lediglich zur Abtrennung dieses konzentrierten Puffers, der sonst bei der Messung von

c-AMP als Störfaktor eingehen würde. Eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zeigt Abbildung 2:

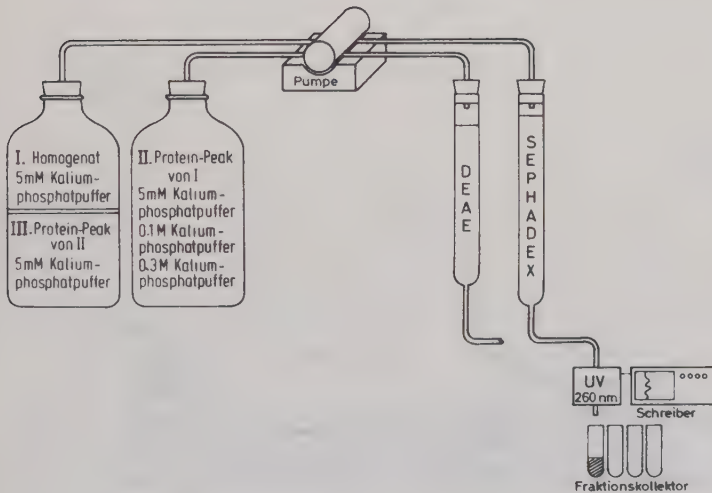


Abb. 2: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Herstellung von c-AMP-bindendem Protein.

1) Die aus der Rinderschulter gewonnene Lösung wird auf die Sephadex G-25 fine Säule aufgebracht.

2) Elution des Proteinpeaks von der Sephadex G-25 fine Säule mit 5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0, in Fraktionen zu je 120 Tropfen (insgesamt ca. 80 Fraktionen, Chromatographie über Nacht). Fraktionen, in denen Protein auftritt, erkennt man deutlich an einer gelblichen Verfärbung, sowie Schaumbildung, während die Fraktionen, die Ammoniumsulfat und andere Salze enthalten, rötlich verfärbt sind, nicht schäumen und bitter-salzig schmecken.

Die Fraktionen, die Protein enthalten (hier 21 bis 35), werden zusammengeschüttet. Die Sephadex G-25 fine Säule steht anschließend bereits wieder für die weitere Chromatographie (s. unter 7) zur Verfügung. Das Elutionsprofil der beschriebenen Chromatographie ist in Abbildung 3 dargestellt.

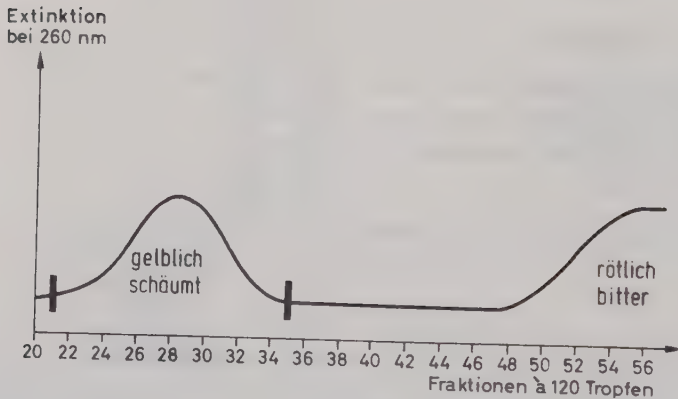


Abb. 3: Trennung von Proteinpeak und Salzpeak mit Hilfe einer Sephadex G-25 fine Säule.

3) Bereits während Punkt 1 und 2 ablaufen, wird mit der Äquilibrierung der DEAE-Cellulose-Säule, ebenfalls mit 5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0, begonnen, da diese Äquilibrierung ca. 15 Stunden beansprucht.

4) Die zusammengegebenen Fraktionen werden auf die DEAE-Cellulose-Säule aufgebracht (3. Tag).

5) Waschen der Säule mit:

- a) 5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0, 350 ml.
- b) 0.1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0, 600 ml.

6) Elution mit 0.3 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0, in Fraktionen zu je 120 Tropfen. Fraktionen 21 bis 40 werden gesammelt. Das Elutionsprofil ist in Abbildung 4 dargestellt:

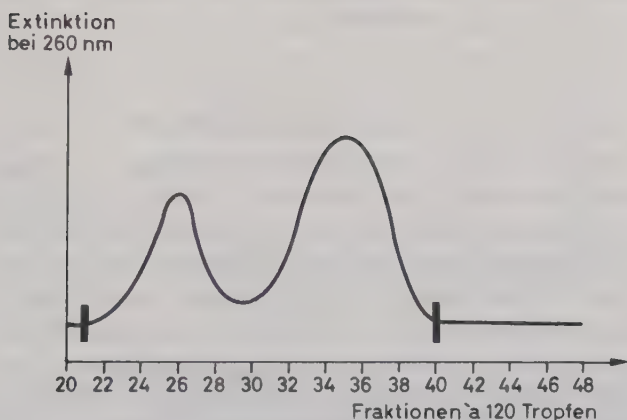


Abb. 4: Elutionsprofil der Proteinkinasefraktionen von der DEAE-Cellulose-Säule (Whatman DE 52).

7) Die gesammelten Fraktionen werden auf die Sephadex G-25-Säule gebracht (3. Tag, nachts).

8) Elution mit 5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0. Fraktionen, die Protein enthalten, werden gesammelt und auf ihre Bindungsfähigkeit untersucht (Abb. 5). Die einzelnen proteinhaltigen Fraktionen werden zusammengeschüttet und zu je 1 ml in Eppendorfgläsern bei einer Temperatur von -80°C aufbewahrt.

Bei dieser Art der Lagerung konnte auch nach einem Jahr kein Verlust an Bindungsaktivität festgestellt werden.

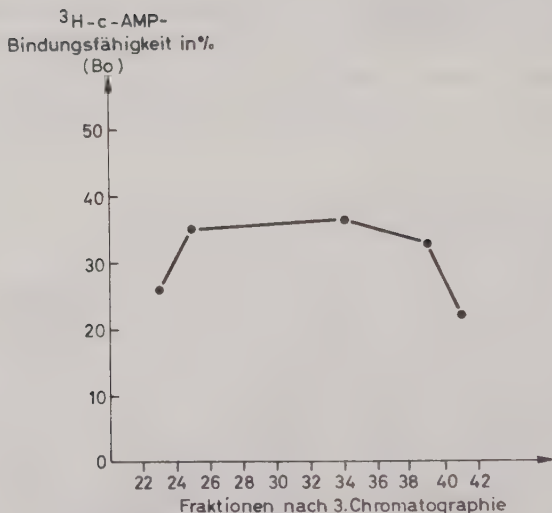


Abb. 5: Die Abbildung zeigt die Bindungsfähigkeit (B_o) der einzelnen Fraktionen in $\frac{3}{3}$ nach der dritten Chromatographie für $^3\text{H-c-AMP}$.

3.1.5. Ausbeute

Das beschriebene Experiment zur Herstellung c-AMP-bindenden Proteins nimmt etwa 3 - 4 Tage in Anspruch. Der Ertrag schwankte bei unseren beiden Präparationen erheblich (66 ml und 190 ml). Die höhere Ausbeute bei der zweiten Präparation ist z.T. durch Einsatz einer größeren Menge Fleisch und größeren Zentrifugenrotoren erklärt.

Bei einem Einsatz von 50 μl Proteinkinase pro tube ergab sich eine genügende Steilheit der Eichkurve, so daß wir uns bei der Durchführung der Experimente für diese Menge entschieden haben. Die zur Verfügung stehende Proteinkinase reicht dann für 1320 bzw. 3800 tubes aus.

Die Bindungsaktivität der hergestellten Proteinkinase beträgt etwa 30 %.

Während bei unseren Versuchen das Bindungsprotein praktisch bei jedem beliebigen Reinheitsgrad hergenommen werden kann, besteht bei Bedarf die Möglichkeit durch Trennen der bei der DEAE-Extraktion gewonnenen Peaks (Benutzen des zweiten Peaks), die Bindungsaktivität noch zu steigern. Wir haben uns für die größere Ausbeute entschieden.

3.1.6. Proteincharakteristika

Nach T.A. LANGAN (32) besitzt die Proteinkinase ein Molekulargewicht von ca. 280 000. Bei nicht ganz frischer Präparation können sich jedoch Molekulargewichte von 140 000 und 80 000 ergeben, die dann in Untereinheiten von 40 000 weiter zerfallen (32). Diese Tatsache spricht für die Theorie der Katalytischen und Bindungseinheit (32). A.G. GILMAN (23) hat herausgefunden, daß sich die größte Affinität des Proteins zu c-AMP bei einem Acetatpuffer von pH 4.0 ergibt. Oberhalb dieses pH wird die c-AMP-Bindung erheblich reduziert. Auch unterhalb eines pH von 3.5 ergeben sich danach drastische Veränderungen hinsichtlich der Bindungsaktivität (23).

3.1.7. Bindungskinetik

Nach A.G. GILMAN (23) wird bei 0° C nach etwa 60 Minuten ein Gleichgewicht der Bindungsreaktion erreicht, das einen Abfall von ungefähr 5 % pro Stunde zu verzeichnen hat.

3.2. Versuchsdurchführung

Die Versuchsdurchführung, die im Prinzip der Methode von A.G.GILMAN (23) entspricht, ist in dieser Form von der Firma Boehringer, Mannheim, ausgearbeitet und von uns mit kleinen Modifikationen versehen, angewendet worden.

3.2.1. Zubehör

- 1) Ammonium-Acetat-Puffer, 0.2 M, pH 4.0 (Lösung 1)
- 2) c-AMP-Standard, 0.2 μ M (Lösung 2)
- 3) ^3H -c-AMP, 38.4 Ci/mMol (Lösung 3)
- 4) c-AMP-bindendes Protein (Lösung 4)
- 5) Kaliumphosphatpuffer, 20 mM, pH 6.0 (Lösung 5)
- 6) Rinderalbuminlösung, 0.1 % (Lösung 6)
- 7) Millipore-Filter, HAWP 025 00, HA 0.45 μ
- 8) Szintillationslösung
- 9) Eppendorffzentrifuge
- 10) Mikroliterpipetten
- 11) Filtriergerät

3.2.2. Herstellung der Lösungen

- Lösung 2) c-AMP-Standard: Bestellnummer 15076 der Firma Boehringer, Mannheim, MG 329.2
Verdünnen mit Aqua dest. bis auf 0.2 μ M.
- Lösung 3) ^3H -c-AMP: Bestellnummer NET-275 der Firma New England Nuclear, D-6072 Dreieichenhain.
Verdünnen mit Aqua dest. ca. 1:600, so daß 20 μ l etwa 60 000 counts/10 min ergeben
- Lösung 7) Szintillationslösung: 8 g 2.5-Diphenyloxazol (PPO) in 1 Liter Toluol lösen. 800 ml dieser Lösung mit 200 ml 2-(Methoxy)-Äthanol mischen.

3.2.2.1. Haltbarkeit der Lösungen

- Lösung 2) c-AMP-Standard: Bei Zimmertemperatur unbegrenzt lange haltbar.
- Lösung 3) ^3H -c-AMP: Bei Lagerung der verdünnten Lösung (s.o.) in Glasgefäßen bei + 4° C hat sich innerhalb von 3 Monaten ein Aktivitätsverlust von 90% ergeben. Bei Lagerung in Plastikgefäßen bei - 30° C und nur ein- bis zweimaligem Auftauen blieb die Aktivität konstant.
- Lösung 7) Szintillationslösung: Bei + 4° C in brauner Glasflasche mindestens 4 Wochen haltbar.

3.2.3. Zubereitung der Proben

Eine besondere Präparation der verwendeten Urine ist nicht notwendig. 24-Stunden-Urine werden mit Aqua dest. 1:100 verdünnt.

3.2.4. Pipettierschema (Benennung in ml)

Alle Pipettierschritte werden bei + 4° C ausgeführt. Es ist wichtig, die verwendeten Eppendorfgefäße vorzukühlen und nur mit eiskalten Lösungen zu arbeiten. Die benötigte 0.1%ige Rinderalbuminlösung läuft schlecht aus den Plastikspitzen ab. Deshalb sollte für jedes Eppendorfgefäß eine neue Spitze verwendet werden. Befindet sich der gesamte Ansatz - bis auf die Proteinkinase - in den Gefäßen, so werden diese in einer Eppendorffzentrifuge etwa 5 Sekunden anzentrifugiert, um an den Wänden der Gefäße hängende Spritzer ins Pipettiergemisch zu schleudern. Nachdem das Gesamtvolumen der tubes bis zu diesem Schritt nur 0.18 ml beträgt, ist es möglich, mit Gefäßen ohne Deckel zu arbeiten, ohne mit Verlusten, bedingt durch die schnelle Beschleunigung bei Beginn der Zentrifugation, rechnen zu müssen.

Nach dem Zentrifugieren werden jedem Eppendorfgefäß - unspezifische Bindung ausgenommen - 0.05 ml Proteinkinase hinzuge-

fügt. Eine Übersicht der einzelnen Pipettierschritte zeigt Abbildung 6:

	unspezif. Bindung	Leerwert (B ₀)	Standards 2 bis 20 pMol	Probe
Acetat-P.	0.05	0.05	0.05	0.05
c-AMP-Stand.	---	---	0.01 bis 0.05	---
Probe	---	---	---	0.10
³ H-c-AMP	0.02	0.02	0.02	0.02
0.1%-R.Alb.	0.16	0.11	0.10 bis 0.06	0.01
kurz zentrifugieren				
Proteinkin.	---	0.05	0.05	0.05

Abb. 6: Darstellung der einzelnen Pipettierschritte bei der Bestimmung von c-AMP nach der Methode von A.G.GILMAN (23), Mengenangaben in ml.

Die im Pipettierschema aufgeführte 0.1%ige Rinderalbuminlösung dient dazu, eine Adsorption von Tritium-markiertem c-AMP an die Wand der Eppendorfgefäße zu verhindern, was zu einer höheren Zählausbeute führt. Wie Versuche mit und ohne Rinderalbuminlösung gezeigt haben, ändert sich die Steilheit der Eichkurve dadurch nicht, es kommt nur zu einer Parallelverschiebung, deren Betrag unabhängig von den verschiedenen Mengen an Rinderalbuminlösung ist, die während der Versuchsdurchführung benützt werden, d.h. selbst die geringste Menge an Rinderalbuminlösung, die bei der Probe einpipettiert wird, reicht aus, eine Adsorption zu verhindern. Messungen des c-AMP-Gehaltes von 24 Stunden- Urinen mit bzw. ohne Zusatz von Rinderalbuminlösung, bei Ablesen an den jeweils entsprechenden Eichkurven, ergeben

identische Ergebnisse. Die ermittelten Werte beim Wiederfinderversuch (siehe 3.3.3.) sprechen ebenfalls dafür, daß das Verwenden verschiedener Proteinmengen keinen nachteiligen Einfluß auf die Methode hat.

Nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten wird jedem Eppendorfgefäß 1 ml eisgekühlter Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0, zugegeben. Anschliessend werden in ein Filtriergerät (Firma H.Hölzel, 825 Dorfen), das aus acht einfachen, in Reihe angeordneten, schornsteinartigen Teflonzylindern besteht, die Milliporefilter eingelegt, die jetzt den Boden der Zylinder bilden. Die einzelnen Zylinder (ca. 2 x 5 cm) sind durch Klammern mit einem quer darunter liegenden Teflonrohr verbunden, an das eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen ist. Die in den Filtrationsapparat gelegten Milliporefilter werden mit etwa 5 ml des Kaliumphosphatpuffers, pH 6,0, angefeuchtet. Der Assayansatz wird mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe und eines dazwischen geschalteten Auffanggefäßes abfiltriert. Anschliessend wird mit etwa 10 ml desselben Puffers nachgewaschen. Es hat sich gezeigt, daß dieses einmalige Nachwaschen genügt, um jegliche Radioaktivität von der Innenwand der Teflonrohre zu entfernen.

Die Filter werden mit einer Pinzette in Szintillationsgefäße (Firma New England Nuclear Chemicals, D-6072 Dreieichenhain) gelegt und unter leichtem Schwenken in 1 ml 2-(Methoxy)-äthanol aufgelöst. Es werden 10 ml der zubereiteten Szintillationslösung hinzugefügt, die Gefäße werden fest zugeschraubt und mindestens 10 Minuten bei + 4° C kräftig geschüttelt. Die Messung erfolgt dann in einem Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer System, Modell 3324 der Firma Packard, Illinois, U.S.A.

Geräteeinstellung: Gain 55%, Window 50 - 1000,
time preset 10 min.

3.2.5. Auswertung

Die Auswertung des Versuches erfolgt mit Hilfe einer Eichkurve im doppelt logarithmischen Maßstab, deren Abszisse mit Standards bekannter Konzentrationen an c-AMP erstellt ist. Die Ordinate kommt aus der Differenz der gemessenen Counts und der unspezifischen Bindung zustande. Die Linearisierung der Kurve im doppelt logarithmischen Maßstab ergibt sich nach A.G.GILMAN (23) immer dann, wenn man im Sättigungsbereich von $^3\text{H-c-AMP}$ mißt. Doppelmeßwerte haben sich als ausreichend erwiesen. Andere Möglichkeiten der Auswertung sind die "einfach reziproke Auftragung" (64, 66) und die "logit Transformation" (44). Der Einsatz der Spline Approximation bedarf noch der Überprüfung.

Der ständig mitpipettierte B_9 -Wert diente lediglich zur Überprüfung des verwendeten $^3\text{H-c-AMP}$. Er schwankte im Laufe der Versuche zwischen 22 000 und 33 000 counts/10 min.

Abbildung 7 zeigt eine typische Eichkurve. Die Eichkurve ist zwischen 1 und 20 pMol/100 μl linear. Da durch Änderung der Probenverdünnung jederzeit im Bereich der Kurve gemessen werden kann, erscheint die Meßbreite der Kurve als völlig ausreichend. Eine weitere Überprüfung der Linearität über die angegebenen Werte hinaus wurde deshalb nicht durchgeführt.

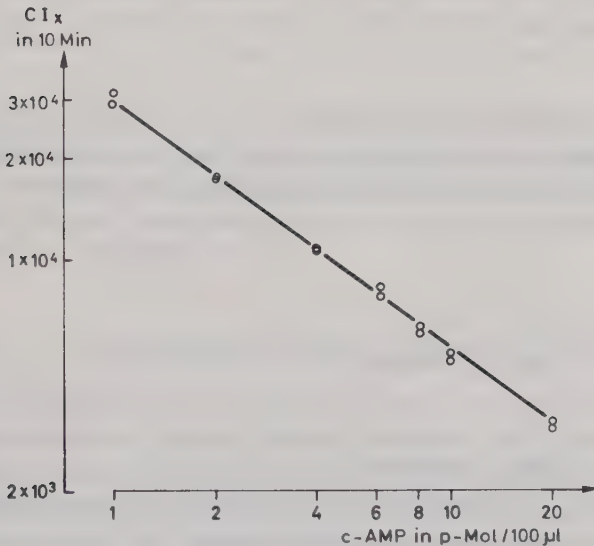


Abb. 7: c-AMP-Eichkurve in doppelt logarithmischer Auf-
tragung. Abszisse: c-AMP-Standards bekannter
Konzentration. Ordinate: C_{IX} = gemessene Counts -
unspezifische Bindung, Zähizeit 10 Minuten.

3.3. Überprüfen der Verlässlichkeit der Methode

3.3.1. Bestimmung bei verschiedenen Verdünnungen

Der 24 Stunden-Urin einer Normalperson wurde 1:50, 1:100 und 1:200 verdünnt und der c-AMP-Gehalt in diesen Proben bestimmt. Für die Verdünnung von 1:100 ergab sich dabei ein Mittelwert von 3.46 pMol/100 µl. Die Mittelwerte für die Verdünnungen von 1:50 und 1:200 lagen bei 7.30 bzw. 1.67 pMol/100 µl, was - auf 1:100 umgerechnet - einer Konzentration von 3.65 bzw. 3.34 pMol/100 µl entspricht.

Die auftretenden Abweichungen von 5.5 bzw. 3.5 % vom theoretisch zu erwartenden Ergebnis liegen innerhalb der Ungenauigkeit der Methode.

3.3.2. Präzision in der Serie

Der 24-Stunden-Urin einer Normalperson ist in einem Versuch zwanzigmal auf seinen c-AMP-Gehalt untersucht worden.

Ergebnis in pMol/100 μ l:

$$\begin{aligned} N &= 20 \\ \bar{x} &= 3.09 \\ SD &= 0.26 \\ VK &= 8.66 \% \end{aligned}$$

3.3.3. Wiederfinderversuch

Der 24-Stunden-Urin eines Patienten der Klinik ist zweimal auf seinen c-AMP-Gehalt untersucht worden. Als Ergebnis hat sich ein Mittelwert von 8.65 pMol/100 μ l ergeben.

50 μ l dieser Verdünnung mit einem errechneten c-AMP-Gehalt von 4.325 pMol sind jeweils zu einem bekannten Standard von 2, 4, 6 und 8 pMol hinzugefügt und die Meßergebnisse anhand einer Eichkurve verglichen worden. Die errechnete Wiederfinderate liegt bei:

$$98.5 \pm 2.98 \% (\bar{x} \pm s ; N = 8).$$

3.4. Beständigkeit der Proben

3.4.1. Beständigkeit der Proben bei Zimmertemperatur

Gleiche Mengen eines 24-Stunden-Urins sind in Reagenzgläser abgefüllt, sofort, nach 24 Stunden, nach 48 Stunden und nach 72 Stunden eingefroren worden. Anschließend haben wir ihren c-AMP-Gehalt bestimmt.

Urinprobe: Sofort eingefroren: 2.47 - 2.77 $\mu\text{Mol/g}$ Kreat.
nach 24h eingefr. : 2.84 - 2.84 $\mu\text{Mol/g}$ Kreat.
nach 48h eingefr. : 2.91 - 2.95 $\mu\text{Mol/g}$ Kreat.
nach 72h eingefr. : 2.47 - 2.52 $\mu\text{Mol/g}$ Kreat.

Das Versuchsergebnis macht deutlich, daß Lagerung bei Zimmertemperatur, zumindest 48 Stunden lang, keinen Abfall des c-AMP-Gehaltes gegenüber sofort eingefrorenen Proben zur Folge hat. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der Literatur (22).

3.4.2. Beständigkeit bei mehrmaligem Auftauen

Wir haben dieselben Urinproben, die wir in Versuch 3.4.1. verwendet haben, bis zu fünfmal aufgetaut und wieder eingefroren und jeweils ihren c-AMP-Gehalt bestimmt. Es konnte keine signifikante Änderung des c-AMP-Gehaltes festgestellt werden.

Urinprobe: 1 x aufgetaut: 2.47 - 2.77 $\mu\text{Mol/g}$ Kreat.
2 x aufgetaut: 2.40 - 2.55 $\mu\text{Mol/g}$ Kreat.
3 x aufgetaut: 2.70 - 2.83 $\mu\text{Mol/g}$ Kreat.
4 x aufgetaut: 2.52 - 2.62 $\mu\text{Mol/g}$ Kreat.
5 x aufgetaut: 2.26 - 2.47 $\mu\text{Mol/g}$ Kreat.

3.5. Bestimmung von c-AMP im 24-Stunden-Urin

3.5.1. Tagesrhythmik

Um festzustellen, ob die c-AMP-Ausscheidung im Urin einer Tagesrhythmik unterliegt, haben acht endokrinologisch- und stoffwechselgesunde Angehörige der Klinik ihren Urin von 6⁰⁰ Uhr morgens bis 21⁰⁰ Uhr abends in dreistündigen Intervallen und dann noch den Urin von 21⁰⁰ Uhr abends bis 6⁰⁰ Uhr morgens des nächsten Tages als Ganzes gesammelt. Die Urinmengen der jeweiligen Sammelperioden sind getrennt eingefro-

ren und anschließend auf ihren c-AMP-Gehalt hin untersucht worden. Dabei hat sich keine einheitliche Tagesrhythmik ergeben, was mit den Ergebnissen von L.R.CHASE (14) übereinstimmt. Dagegen ist die Forschergruppe um J.SAGEL (45) zu gegensätzlichen Ergebnissen gekommen. Es haben sich bei uns lediglich z.T. beträchtliche individuelle Schwankungen der c-AMP-Ausscheidung gefunden. Die Frage, ob es sich hierbei um das Vorliegen einer individuellen Rhythmik handelt, muß noch abgeklärt werden.

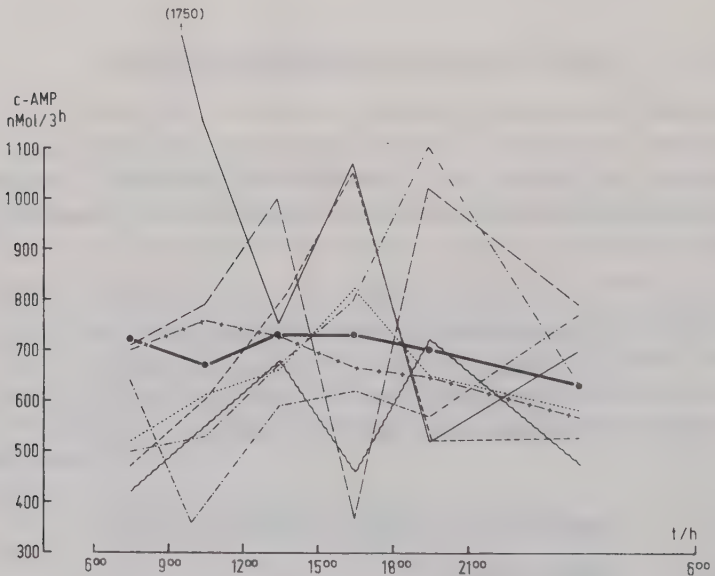


Abb. 8: Die Abbildung zeigt die c-AMP-Ausscheidung der 8 Testpersonen während der gesamten Sammelperiode. Die dick gezeichnete Kurve entspricht der sich aus den einzelnen Profilen errechnenden Mittelwertkurve.

3.5.2. Normalkollektiv

3.5.2.1. Normalkollektiv in $\mu\text{Mol}/24\text{h}$

Es sind 30 stoffwechselgesunde Angehörige der Klinik und 5 Patienten ohne endokrine Erkrankung untersucht worden. Für den c-AMP-Gehalt in 24-Stunden-Urinen haben sich folgende Werte ergeben, wobei annähernd eine Gauß'sche Normalverteilung vorgelegen hat. Der Variationskoeffizient von 24.3% ist für das eventuelle Vorliegen einer logarithmischen Normalverteilung zu klein.

$$\begin{aligned} N &= 35 \\ \bar{x} &= 5.18 \\ SD &= 1.48 \\ \bar{x} \pm 2 SD &= 2.22 - 8.14 \\ x_{\min} &= 2.58 \\ x_{\max} &= 8.94 \end{aligned}$$

3.5.2.2. Normalkollektiv in $\mu\text{Mol}/\text{g}$ Kreatinin

Auf Grund des engen Zusammenhanges von c-AMP-Gehalt des Urins auf der einen und der Nierenfunktion auf der anderen Seite scheint es sinnvoll, wie auch von anderen Autoren vorgeschlagen (39, 40) und in der Diskussion dieser Arbeit beschrieben, die Ergebnisse auf die Kreatininausscheidung zu beziehen.

Ergebnis:

$$\begin{aligned} N &= 35 \\ \bar{x} &= 3.15 \\ SD &= 0.85 \\ \bar{x} \pm 2 SD &= 1.45 - 4.85 \\ x_{\min} &= 1.79 \\ x_{\max} &= 5.27 \end{aligned}$$

3.5.2.3. Normalkollektiv in $\mu\text{Mol}/100 \text{ ml}/\text{min}$ Kreatinin-Clearance

Eine dritte Möglichkeit der Auswertung entsteht durch Berücksichtigung des Glomerulumfiltrates, d.h. Berechnung der c-AMP-Ausscheidung in 24 Stunden pro 100 ml/min Kreatinin-Clearance, wie von H.SCHMIDT-GAYK (47) vorgeschlagen.

$$\begin{aligned} N &= 19 \\ \bar{x} &= 4.79 \\ SD &= 1.23 \\ \bar{x} \pm 2 SD &= 2.33 - 7.25 \\ x_{\min} &= 3.04 \\ x_{\max} &= 7.60 \end{aligned}$$

3.5.2.4. Beurteilung

Bei Einbeziehen der Kreatinin-Ausscheidung während 24 Stunden ergibt sich gegenüber den nur auf 24 Std. bezogenen c-AMP-Werten ein deutlich niedrigeres $\bar{x}$ sowie eine geringere Standardabweichung, was durch die im Mittel über ein Gramm liegende Kreatinin-Ausscheidung der gesunden Erwachsenen bedingt ist.

Die Zuhilfenahme der Kreatinin-Clearance bringt keine entscheidende Veränderung des Mittelwertes und der Standardabweichung. Dies läßt sich dadurch erklären, daß die Kreatinin-Clearance-Werte unserer Normalpersonen symmetrisch um 100 ml/min oszillieren und dadurch im Mittel als Faktor 1 in die Rechnung eingehen.

3.5.3. Patientenkollektiv

3.5.3.1. Patienten mit primärem Hyperparathyreoidismus

Zehn Patienten mit diagnostiziertem Nebenschilddrüsenadenom (neun histologisch einwandfrei, bei einem konnte die Unterscheidung zwischen einem Adenom oder eine Hyperplasie auf

Grund des unzureichenden histologischen Präparates nicht exakt vorgenommen werden), normaler oder nur gering eingeschränkter Nierenfunktion, haben gegenüber der Normalgruppe entscheidend höhere c-AMP-Spiegel im 24-Stunden-Urin aufgewiesen. Bei Berücksichtigung der verschiedenen Parameter haben sich folgende Werte ergeben:

$\mu\text{Mol}/24\text{h}$	: $6.88 \pm 2.26 (\bar{x} \pm s)$
$\mu\text{Mol/g-Kreatinin}$	: $6.54 \pm 2.61 (\bar{x} \pm s)$
$\mu\text{Mol}/100 \text{ ml/min}$ Clearance	: $8.24 \pm 2.23 (\bar{x} \pm s)$

Über die unterschiedliche Abgrenzbarkeit der verschiedenen Kollektive, vor allem der Normalpersonen und der pHTP-Patienten, die sich nach Einbeziehen der einzelnen Parameter ergibt, wird auf den kommenden Seiten in den Tabellen 2 und 3 sowie in der Diskussion dieser Arbeit ausführlich Stellung genommen.

3.5.3.2. Patienten mit vermutetem Hyperparathyreoidismus

Es sind die 24-Stunden-Urine von 5 Patienten untersucht worden, deren Diagnose noch offen ist. Die Patienten weisen rezidivierende Hyperkalziämien, Nephrolithiasis und zum Teil fehlende Supprimierbarkeit der Phosphatclearance im Ca^{++} -Belastungstest auf. In keinem Fall konnte die Diagnose pHTP gesichert werden, so daß bis jetzt auch keine Operation erfolgt ist.

Ergebnis der c-AMP-Bestimmung:

$\mu\text{Mol}/24 \text{ h}$	: $7.43 \pm 3.20 (\bar{x} \pm s)$
$\mu\text{Mol/g-Kreatinin}$	: $4.40 \pm 1.14 (\bar{x} \pm s)$
$\mu\text{Mol}/100 \text{ ml/min}$ Clearance	: $7.46 \pm 2.13 (\bar{x} \pm s)$

3.5.3.3. Vergleich der c-AMP-Ergebnisse mit anderen diagnostischen Methoden

Bekanntermaßen bereiten die Patienten mit nur geringgradig erhöhtem oder normalem Serumkalzium differentialdiagnostisch die größten Schwierigkeiten. Um auch in diesen Fällen den Stellenwert der c-AMP-Bestimmung besser beurteilen zu können, haben wir die Ergebnisse, die wir sowohl bei den Patienten mit histologisch gesichertem pHPT als auch bei den Personen mit vermutetem pHPT erhalten haben, mit den bisher gebräuchlichsten Methoden verglichen. Es handelt sich dabei um die Phosphatclearanceänderung durch eine Ca^{++} -Belastung nach L.H.KYLE (30) und um die tubuläre Phosphatrückresorption (TRP), die folgendermaßen errechnet wird:

$$\text{TRP} = \left(1 - \frac{\text{Phosphatclearance (C}_P\text{)}}{\text{Kreatininclearance (C}_{kr}\text{)}} \right) \times 100 \text{ \%}$$

In Tabelle 2 sind die dabei erhaltenen Befunde zusammengefaßt:

Tab. 2:

Die Tabelle zeigt alle gemessenen Einzelwerte der verschiedenen benutzten Parameter sowohl der zehn Patienten mit gesichertem pHPT als auch der fünf Patienten mit vermutetem pHPT. Zusätzlich sind bei den Patienten mit gesichertem pHPT alle Werte unterstrichen, die dem histologischen bzw. klinischen Befund entsprechend richtig positive Ergebnisse liefern. Dabei kommt es nur bei 2 der 10 Patienten durch Übereinstimmen aller Parameter zu einer einheitlich positiven Diagnose. Die in der Tabelle aufgeführten Parathormonwerte sind uns freundlicherweise von Herrn Priv.-Doz. Dr. Damacher, Bürgerhospital, Basel) zur Verfügung gestellt worden. Sie wurden mit Hilfe carboxyterminaler Assays (Antikörper GP I und "LuLu") erhalten (20a). Da die Sensitivität des einen Antikörper ("LuLu") nicht immer ausreicht, um Normalwerte zu erfassen, ist in der Tabelle für beide Assays jeweils die obere Normgrenze angegeben.

Pat. von 3.5.3.1.	$\mu\text{Mol/}$ 24 h	c-AMP-Aussch. $\mu\text{Mol/}$ g-Kreat. 100 ml/ min C_{Kr}	Serum/mg% PO_4 Ca	C_p -Körper.korr. auf 100 ml C_{Kr}	TRP %	Parathormon Normalwerte: (ob. Normgrenze) LuLu: 0.6 ng/ml GP I: 40 ng/ml		
V.X.	4.10	3.13	4.95	2.61	11.67	-7.3 %	75.4	65 ng/ml GP I
B.A.	4.84	7.45	7.40	2.81	12.16	-31.0 %	85.5	32 ng/ml GP I
S.E.	8.25	8.39	8.57	2.84	11.71	+15.0 %	88.3	98 ng/ml GP I
K.X.	9.20	6.22	10.30	2.73	12.41	-31.4 %	69.3	2.25 ng/ml LuLu
R.T.	6.36	5.62	5.85	2.81	11.70	+15.0 %	87.8	32 ng/ml GP I
M.B.	9.07	12.15	8.65	2.75	12.30	-63.5 %	88.3	55 ng/ml GP I
S.X.	9.09	5.76	10.75	2.38	10.85	-32.0 %	58.5	1.3 ng/ml LuLu
N.O.	5.70	3.46	5.79	2.38	12.10	—	77.0	—
D.E.	10.67	5.35	11.54	1.97	12.50	-11.0 %	87.5	—
K.X.	6.12	7.92	8.60	3.30	14.20	—	77.0	—
Pat. von 3.5.3.2.								
W.X.	12.75	5.65	9.36	2.73	9.80	-30.0 %	87.0	—
M.H.	8.01	5.54	8.00	3.87	10.40	+10.8 %	94.4	—
D.N.	6.12	3.65	6.26	2.70	11.46	+7.0 %	92.2	28 ng/ml GP I
P.A.	5.43	3.07	4.38	4.08	11.17	-39.0 %	87.0	—
E.U.	4.85	4.10	9.32	2.41	10.60	+30.0 %	77.1	14 ng/ml GP I

Vergleicht man die Wertigkeit der einzelnen Parameter an Hand der Ergebnisse, die wir bei den Patienten mit gesichertem pHPT (3.5.3.1.) erhalten haben, so ergibt sich folgendes Bild, das in Tabelle 3 dargestellt ist:

Tab. 3: Es sind die falsch negativen Ergebnisse dargestellt (%), die sich bei unseren Versuchen bei Einbeziehen der einzelnen Parameter im Falle der Patienten mit gesichertem pHPT ergeben haben.

Parameter	falsch negative Ergebnisse	
c-AMP-Bestimmung (s.auch 3.5.3.6., Abb. 12)		
µMol/24h	50 %	d.h.: 5 der 10 Werte liegen im Normalbereich
µMol/g-Kreatinin	20 %	" : 2 der 10 Werte liegen im Normalbereich
µMol/100 ml/min Kreatinin-Clearance	30 %	" : 3 der 10 Werte liegen im Normalbereich
Phosphatclearanceänderung	12.5 %	d.h.: 1 der 8 Werte liegt im Normalbereich (def.als > -45%, 14a)
TRP	40 %	d.h.: 4 der 10 Werte liegen im Normalbereich (def.als TRP ≥ 85%, 30a)
PTH-Bestimmung	28 %	d.h.: 2 der 7 Werte liegen im Normalbereich

Die Ergebnisse bei den Patienten mit vermutetem pHPT können in diesem Rahmen leider noch nicht interpretiert werden, da noch in keinem der fünf Fälle eine histologische Sicherung der klinischen Diagnose vorgenommen werden konnte.

3.5.3.4. Patienten mit nicht PTH-bedingten, ossären Erkrankungen

Die Urine von drei Patienten mit Osteoporose, Osteomalazie und Akromegalie haben folgende c-AMP-Werte im 24-Stunden-Urin aufgewiesen:

$\mu\text{Mol}/24 \text{ h}$	:	$6.55 \pm 2.90 (\bar{x} \pm s)$
$\mu\text{Mol}/\text{g-Kreatinin}$	:	$4.15 \pm 0.97 (\bar{x} \pm s)$
$\mu\text{Mol}/100 \text{ ml/min}$ Clearance	:	$5.84 \pm 1.70 (\bar{x} \pm s)$

3.5.3.5. Malignom-Patienten mit Hyperkalziämie

Vier Patienten mit Hyperkalziämie, die an einem malignen Melanom, an einem Bronchialkarzinom, an einem Colonkarzinom und an einem Mammakarzinom erkrankt gewesen sind, sind untersucht worden. Die Nierenfunktion der Patienten ist bereits eingeschränkt gewesen. Es haben sich folgende c-AMP-Werte im 24-Stunden-Urin ergeben:

$\mu\text{Mol}/24\text{h}$	:	$4.48 \pm 2.22 (\bar{x} \pm s)$
$\mu\text{Mol}/\text{g-Kreatinin}$	:	$4.70 \pm 1.63 (\bar{x} \pm s)$
$\mu\text{Mol}/100 \text{ ml/min}$ Clearance	:	$7.01 \pm 1.86 (\bar{x} \pm s)$

3.5.3.6. Beurteilung

Die Ergebnisse zeigen, daß mit Hilfe der c-AMP-Bestimmung im Urin in den meisten Fällen eine diagnostische Trennung zwischen Normalpersonen und Patienten mit gesichertem Hyperparathyreoidismus erreicht werden kann.

Die Differentialdiagnose scheint bei Einbeziehen der Kreatinin-ausscheidung am besten möglich (Abb. 10). Die Zuhilfenahme der Kreatinin-Clearance (Abb. 11) wirkt sich erst bei sehr stark eingeschränkter Nierenfunktion differentialdiagnostisch positiv aus. So bei einer Patientin (E.U.), deren Kreatinin-

Clearance zum Zeitpunkt der Untersuchung nur 52 ml/min betragen hat. Obwohl nach einer Operation, bei der 3 Epithelkörperchen entfernt worden sind, histologisch kein Anzeichen für eine Hyperplasie oder Adenom gefunden werden konnte, besteht auf Grund fortwährender, leichter Hyperkalzämien sowie fehlender Supprimierbarkeit im Kyle-Test der dringende Verdacht auf primären Hyperparathyreoidismus. Während die c-AMP-Ausscheidung, bezogen auf 24 h und 24 h-g-Kreatinin, im Normbereich liegt, bringt das Einbeziehen der Kreatinin-Clearance als Parameter für die c-AMP-Ausscheidung einen Wert, der deutlich über dem Normbereich liegt (s. Abb. 12 ). Zusätzlich haben wir eine Patientin mit Verdacht auf tertiären Hyperparathyreoidismus untersucht, deren Serumkreatinin 8 mg% betragen hat. Als c-AMP/24 h-Wert hat sich 0.57 - 0.60 μMol ergeben, während Einbeziehen der Kreatinin-Clearance (ca. 1 ml/min) ein Ergebnis von 196.5 - 206.8 $\mu\text{Mol}/100 \text{ ml/min}$ Kreatinin-Clearance zur Folge hatte. Die sich daraus ergebende Diagnose wäre in diesem Fall jedoch auch mit der Kreatininausscheidung als Bezugspunkt möglich gewesen, da sich hierfür Werte zwischen 17.45 und 18.18 μMol ergeben haben.

In den Abbildungen 9 - 11 sind die erhobenen Befunde noch einmal zusammenfassend dargestellt, wobei sowohl die Mittelwerte mit S.E., als auch die jeweils gemessenen Einzelwerte eingezeichnet sind. Abbildung 12 zeigt die durch bewußtes Verändern der Maßstäbe auf gleiche Größe gebrachten Normalbereiche ($\bar{x} \pm 2 \text{ SD}$), bezogen auf die verschiedenen Parameter, sowie die ermittelten Einzelwerte der Patienten mit primärem Hyperparathyreoidismus (3.5.3.1.). Ebenfalls sind die Einzelwerte der oben beschriebenen Patientin (E.U.) mit eingeschränkter Kreatinin-Clearance (52 ml/min) eingezeichnet ().

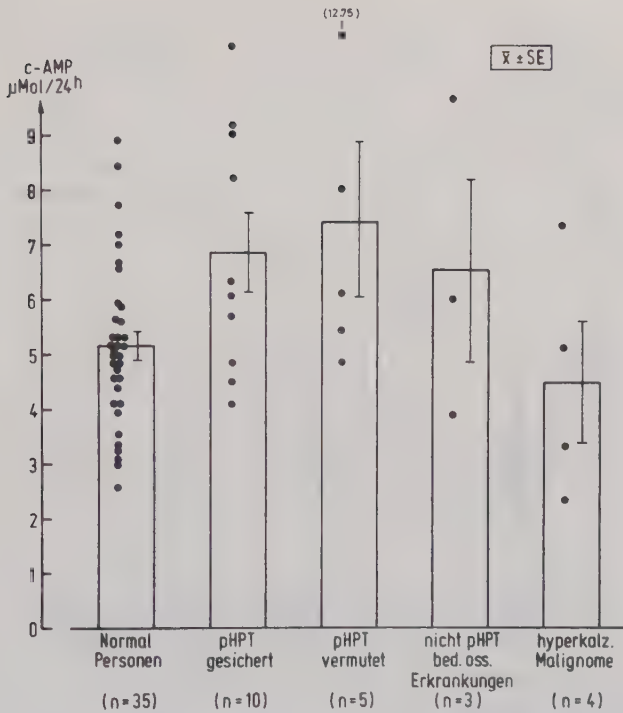


Abb. 9: Die Abbildung zeigt sowohl den errechneten Mittelwert $\bar{x} \pm \text{S.E.}$ als auch die gemessenen Einzelwerte für die c-AMP-Ausscheidung im 24-Stunden-Urin ($\mu\text{Mol}/24\text{ h}$) unseres Normalkollektivs sowie aller untersuchten Patienten.

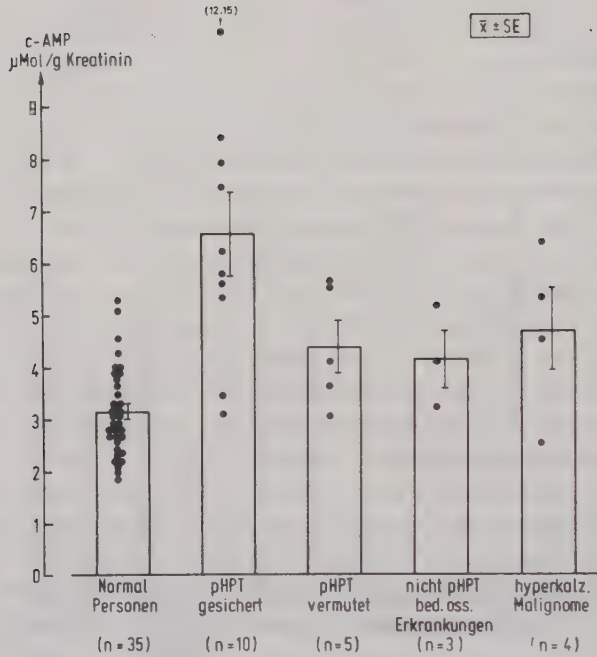


Abb. 10: Wie Abbildung 9, jedoch mit anderem Parameter für die c-AMP-Ausscheidung: μMol/g-Kreatinin.

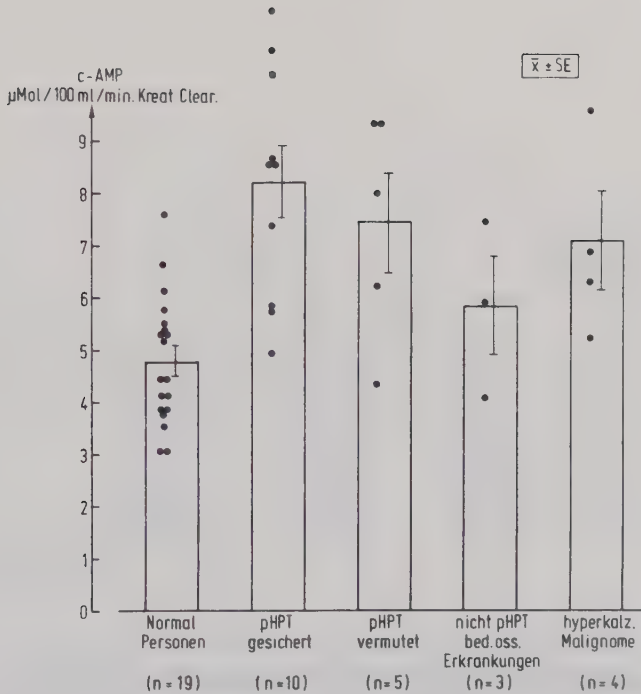


Abb. 11: Wie Abbildung 9, jedoch mit anderem Parameter für die c-AMP-Ausscheidung: μMol/100 ml/min Kreatinin-Clearance.

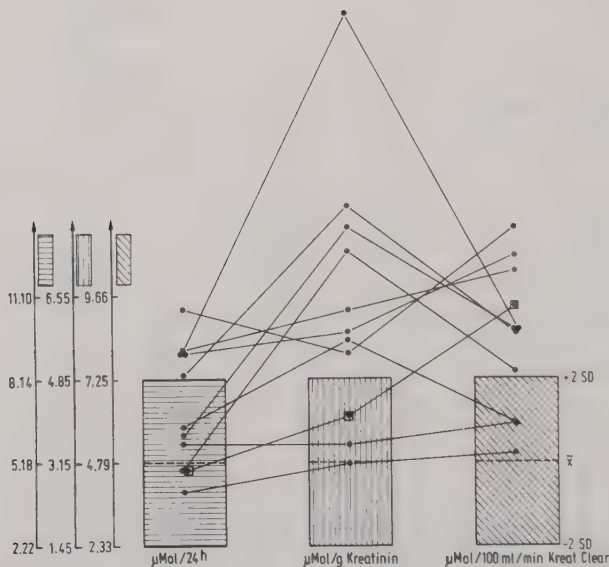


Abb. 12: Die Abbildung zeigt die auf gleiche Größe gebrachten Normalbereiche ($\bar{x} \pm 2$ SD), bezogen auf die verschiedenen Parameter, sowie die gemessenen Einzelwerte der Patienten mit primärem Hyperparathyreoidismus (3.5.3.1.), sowie der Patientin (E.U.) mit einem fraglichen pHPT und eingeschränkter Kreatinin-Clearance (52 ml/min) [1].

3.5.4. Prä- und postoperative c-AMP-Bestimmung bei einem Patienten mit primärem Hyperparathyreoidismus

Der Urin eines Patienten mit histologisch gesichertem Epithelkörperadenom ist auf seinen c-AMP-Gehalt untersucht worden. Das Ergebnis lag mit 5.3 - 5.4 μ Mol/g-Kreatinin oberhalb des Normalbereiches.

Nach der ersten Operation, bei der 3 Epithelkörperchen entfernt worden sind, ist der c-AMP-Gehalt des Urins in den Normbereich abgefallen. Nachdem das Serumkalzium dagegen pathologisch erhöht geblieben ist, hat man sich zu einer zweiten Operation mit Sternalespaltung entschlossen. Es ist dabei ein im vorderen Mediastinum gelegener, faustgroßer Tumor entfernt worden, der jedoch histologisch keine Anzeichen auf Epithelgewebe erkennen lassen hat. Der c-AMP-Gehalt ist nach dieser Operation noch weiter abgefallen, ist jedoch nach acht Tagen wieder auf Werte angestiegen, die dem nach der ersten Operation gemessenen entsprechen. Auch bei weiteren Kontrollen in den nächsten sechs Monaten ist der Wert im Normalbereich geblieben. Der Serum-Kalzium-Spiegel liegt bei dem Patienten jetzt ebenfalls im oberen Bereich der Norm. Abbildung 13 zeigt eine graphische Darstellung der Ergebnisse:

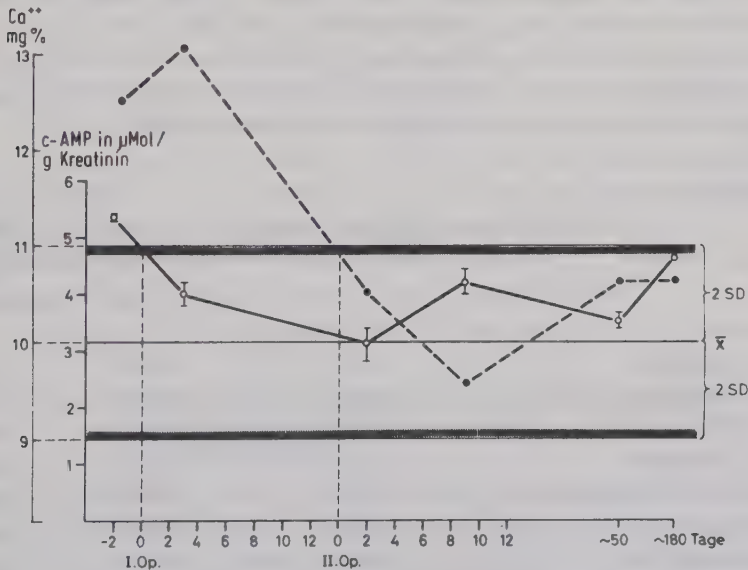


Abb. 13: Die Abbildung zeigt neben dem präoperativen Doppelwert für den c-AMP-Gehalt des 24-Stunden-Urins (in $\mu\text{Mol/g}$ -Kreatinin) eines Patienten mit primärem Hyperparathyreoidismus alle weiteren gemessenen Doppelwerte bis ca. sechs Monate nach der 2. Operation. Normalbereich: $\bar{x} \pm 2$ SD (s.3.5.2.2.). Zum weiteren Vergleich sind die in dieser Zeit gemessenen Serumkalziumwerte ($\text{mg}\%$) aufgeführt.

3.5.5. c-AMP-Bestimmung im Urin, vor und nach Ca^{++} -Suppression

Um bei entsprechendem klinischem Verdacht das Vorliegen einer pathologischen Nebenschilddrüsenfunktion ausschließen oder bestätigen zu können, mißt man beim Patienten u.a. die Veränderung der Phosphat-Clearance durch eine Ca^{++} -Belastung nach L.H.KYLE (30). Da diese Methode aufwendig ist und nicht immer zu eindeutigen Ergebnissen führt, brächte eine mögliche Unterscheidbarkeit zwischen Normalpersonen und Patienten mit pHPT mit Hilfe der c-AMP-Bestimmung eine echte diagnostische Verbesserung.

Zusätzlich durch eine Veröffentlichung von P.O.SCHWILLE und N.M.SAMBERGER (49) angeregt, in der obige Überlegung durch experimentelle Befunde gestützt wird, haben wir die c-AMP-Ausscheidung bei einer Normalperson sowie sechs an pHPT erkrankten Patienten untersucht, wobei vier Fälle histologisch gesichert gewesen sind, die restlichen zwei auf Grund der klinischen Befunde den Verdacht auf pHPT nahegelegt haben. Die c-AMP-Messung ist vor und nach Ca^{++} -Suppression erfolgt und mit der Phosphatclearance-Änderung verglichen worden.

Ergebnisse:

	Phosphatclearance-Änderung nach Ca^{++} -Infusion	c-AMP-Ausscheidung in $\mu\text{Mol/g}$ -Kreatinin vor Ca^{++} -Infusion	nach Ca^{++} -Infusion
A.H. (normal)	- 95 %	5.95	9.56
V.R. (Adenom)	- 6 %	6.00	3.62
K.E. (Adenom)	+ 23 %	5.35	6.86
M.B. (Adenom)	- 73 % !	39.00	29.50
S.M. (Hyperplasie)	- 28 %	39.65	13.77
E.U. (pHPT ?)	+ 60 %	10.33	14.95
R.T. (pHPT ?)	+ 44 %	34.42	25.35

Während bei der Normalperson nach Ca^{++} -Infusion keine Abnahme, sondern sogar eine Zunahme der c-AMP-Ausscheidung pro g-Kreatinin

erfolgt, scheint bei drei der gesicherten Adenom-Patienten (V.R., S.M. und M.B.) der c-AMP-Spiegel nach Ca^{++} -Infusion niedriger zu sein. Bei einem dieser beiden Patienten ist übrigens auch die Phosphatclearance nach Ca^{++} -Infusion um 73 % erniedrigt.

Diese im ersten Augenblick überraschenden Ergebnisse könnten durch den Wirkungsmechanismus des Parathormones an der Niere, genauer am proximalen Tubulus, bedingt sein. Eine Stimulation der c-AMP-Ausscheidung durch Parathormongabe führt zu einem Anstieg des aktiv sezernierten Anteils auf bis zu 94 % (s. Einleitung). Suppression der Parathormonausscheidung führt dagegen lediglich zu einer Hemmung des aktiv sezernierten Anteils, der normalerweise nur etwa ein Drittel der Gesamtausscheidung beträgt, und läßt den glomerulär filtrierten Anteil (2/3) völlig unbeeinflußt. Daraus folgt, daß die c-AMP-Ausscheidung nach Kalzium-Suppression nur auf etwa zwei Drittel des Ausgangswertes reduziert werden könnte. Vollständige c-AMP-"Suppression" erfolgt nicht. Die deutlich niedrigere c-AMP-Ausscheidung nach Ca^{++} -Infusion der Patienten V.R., S.M. und M.B. könnte vielleicht auf die beträchtlichen individuellen Tagesschwankungen (s.3.5.1.) zurückzuführen sein, wobei die um 75 % niedrigere Phosphatclearance nach Ca^{++} -Infusion bei operativ gesichertem Adenom (M.B.) die bestehenden diagnostischen Schwierigkeiten noch verdeutlicht.

3.5.6. c-AMP-Bestimmung im Urin bei einer Patientin mit Pseudohypoparathyreoidismus, vor und nach Parathormongabe

Bei einer jetzt (1974) 23 Jahre alten Patientin mit Pseudohypoparathyreoidismus, der bereits in ihrer Kindheit diagnostiziert worden ist, haben wir die Phosphat-Clearance vor und nach Parathormongabe, im Sinne eines ELLSWORTH-HOWARD-Testes (20) gemessen. Zusätzlich haben wir die Größe der c-AMP-Ausscheidung in den Urin bestimmt und die Ergebnisse mit den Werten einer Normalperson verglichen. Die Patientin hat zur Zeit der Versuchsdurchführung folgende klinische Symptome aufgewiesen:

- Gehirn: : Stammganglienverkalkung, keine Oligophrenie.
- Schilddrüse : Schwere primäre Hypothyreose.
Die Patientin steht unter einer Substitutionstherapie mit 2 x 1 Tbl. Novothyral. Trotz dieser Therapie fanden sich z.Zt. dieser Untersuchung immer noch leicht erniedrigte periphere Schilddrüsenwerte:
Sog. freies T₃: 31.2 % (Normb.32-42 %)
T₄ : 3.5 µg% (" 4.5 - 10.0 µg%),
gleichzeitig war der TSH-Basalspiegel auf 5 µE/ml erhöht und durch TRH (Thyreotropin Releasing Hormone) überschliessend auf 40 µE/ml zu stimulieren. Thyreoglobulin-Antikörper waren nicht nachweisbar.
- Haut und Muskel: : Verkalkungen der Haut sowie der Muskulatur der Ober- und Unterschenkel, Rundgesicht.
- Skelett : Kleinwuchs, leichte Osteoporose, Kapselverkalkung des rechten Hüftgelenkes, Bradymetakarpie, Bradymetatarsie
- Laborwerte (mg%) :
- | | Serum |
|----------------------|----------------|
| Kreatinin | 0.75 mg/100 ml |
| Ca ⁺⁺ | 7.30 mg/100 ml |
| Phosphor | 4.75 mg/100 ml |
| alkal.Phosphatase | 84.0 U/L |
| (normal bis 170 U/L) | |

Eine Woche vor der Versuchsdurchführung ist die Therapie mit Aludrox (3 x 2 Tabletten) und Calcium forte (3 x 1 Tablette) abgesetzt worden. Die Medikation mit AT 10 (tägl. 2 x 1 Kapsel) ist weitergelaufen.

3.5.6.1. Versuchsdurchführung

Der Versuch hat zwei Tage in Anspruch genommen, wobei der erste Tag auf eine Leerperiode (24a), der zweite Tag auf den eigentlichen ELLSWORTH-HOWARD-Test entfallen ist. Es ist neben der Patientin noch eine gesunde Kontrollperson untersucht worden,

um die regelrechte Wirksamkeit des gelieferten Parathormons bestätigt zu sehen. Die Versuchspersonen sind während des gesamten Experiments nüchtern gewesen. Sowohl bei der Patientin als auch bei der Normalperson haben wir folgendes Schema angewendet:

Zu Beginn des Versuches um 8⁰⁰ Uhr wird die Blase entleert, gleich anschließend sowie nach jeder halben Stunde müssen beide Beteiligte je 250 ml ungesüßten Tee trinken. Außerdem wird stundenweise Urin gesammelt und Blut abgenommen. Um 11⁰⁰ Uhr werden am ersten Tag 100 ml Laevulose + 0.5 %ige Human-Albuminlösung über 15 Minuten infundiert, am zweiten Tag zusätzlich 200 USP Parathormon in dieser Lösung (Firma Eli Lilly & Co., Indianapolis, U.S.A., 100 USP $\hat{=}$ ca. 40 mg Hormon).

Jeweils nach der Infusion wird zweimal für eine halbe Stunde Urin gesammelt und Blut entnommen. Ab 12⁰⁰ Uhr wird wieder das gleiche Schema angewendet, wie oben beschrieben, d.h. alle 30 Minuten 250 ml Tee trinken, stundenweise Urin sammeln und Blut entnehmen.

Versuchsende war in unserem Fall um 16⁰⁰ Uhr. Die gewonnenen Blutproben sind zentrifugiert und das Serum sowie ein Aliquot der gesammelten Urinproben, nach Volumenbestimmung, bei -30° C eingefroren worden.

3.5.6.2. Versuchsergebnisse

Die Auswertung ist einerseits im Sinne des ELLSWORTH-HOWARD-Testes (20) erfolgt, d.h. Messen der Phosphat-Clearance vor und nach PTH-Gabe, andererseits mit Hilfe der c-AMP-Bestimmung.

Der Bezugspunkt einer veränderten c-AMP- bzw. Phosphat-Ausscheidung nach PTH-Gabe bzw. Placebo-Gabe ist jeweils der Mittelwert der drei gesammelten Proben vor den Infusionen (9⁰⁰, 10⁰⁰ und 11⁰⁰ Uhr):

Die Größe der Änderung wird als Quotient Phosphat-Clearance zu Kreatinin-Clearance (C_{ph}/C_{kreat}) bzw. als c-AMP-Konzentrations-

änderung in $\mu\text{Mol/g}$ -Kreatinin ausgedrückt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 14 und 15 aufgezeichnet.

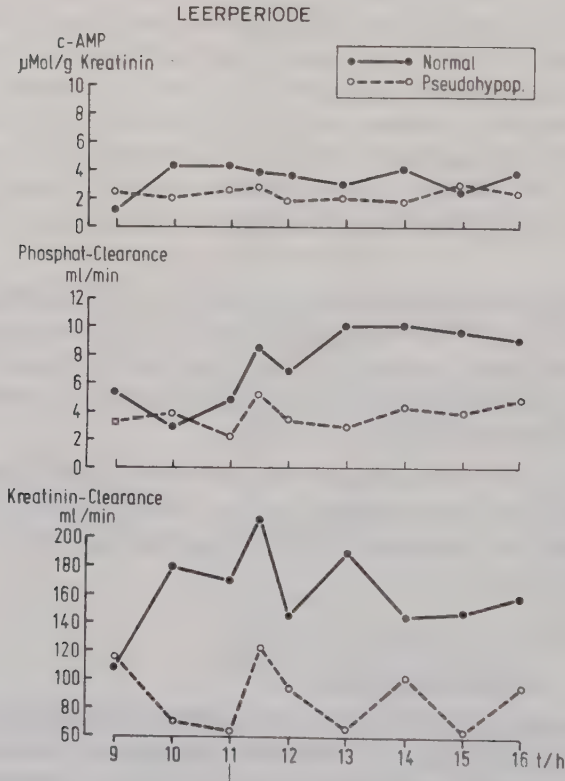


Abb. 14: Die Abbildung zeigt sowohl die c-AMP-Ausscheidung in $\mu\text{Mol/g}$ -Kreatinin, als auch die Phosphat-Clearance in ml/min während der gesamten Leerperiode bei der Patientin mit Pseudohypoparathyreoidismus und bei der Normalperson vor und nach Gabe von 100 ml Laevulose + 0.5 % Human-Albumin um 11.00 Uhr. Zusätzlich ist jeweils die Kreatinin-Clearance in ml/min eingezeichnet.

ELLSWORTH-HOWARD-TEST

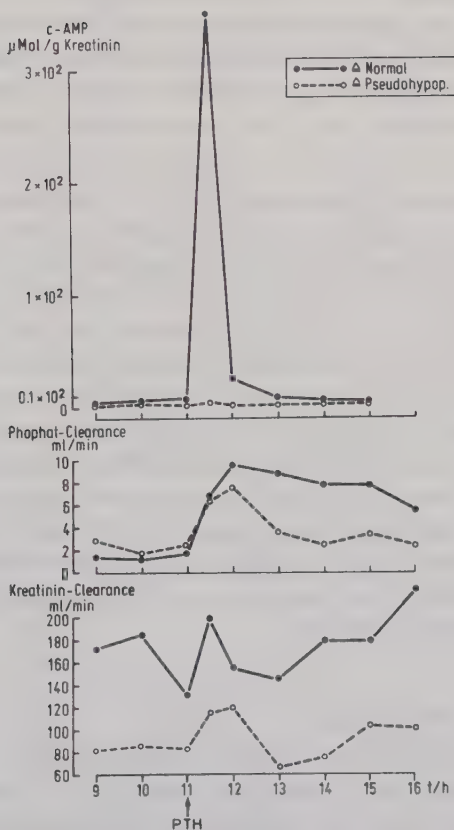


Abb. 15: Die Abbildung zeigt sowohl die Phosphat-Clearance und Kreatinin-Clearance in ml/min als auch die c-AMP-Ausscheidung, wie in Abb. 14 beschrieben, am Tage der Parathormongabe (200 USP $\pm$ ca. 40 mg Hormon, Fa. Eli Lilly & Co., Indianapolis, U.S.A.)

Während die Normalperson auf Laevulosegabe merkwürdigerweise mit einer leichten Steigerung der Phosphat- und Kreatinin-Clearance antwortet (Faktor 1.72), bleibt die Phosphatausscheidung der Patientin im Mittel nahezu unverändert (Faktor 1.19). Die Größe der c-AMP-Ausscheidung erweist sich während der gesamten Leerperiode bei beiden Versuchspersonen als konstant, wobei der durchschnittlich höhere c-AMP-Gehalt des Urins der Normalperson als Ausdruck der intakten Parathormonwirkung zu erwarten war.

Auf die Gabe von Parathormon steigt bei beiden Versuchspersonen die Phosphatausscheidung an. Die Steigerung des Quotienten "Phosphat-Clearance zu Kreatinin-Clearance" ist dagegen bei der Normalperson mit etwa 8 gegenüber der Leerperiode deutlich höher als bei der Patientin, die aber auch eine Steigerung von ca. 2.50 zeigt. Dabei wurde auch am zweiten Versuchstag auf den Durchschnitt der ersten drei Werte (9⁰⁰, 10⁰⁰ und 11⁰⁰ Uhr) Bezug genommen. Das Ergebnis der c-AMP-Messung vor und nach Parathormongabe führt zu einer deutlich besseren Abgrenzung der beiden Versuchspersonen voneinander. Während die an Pseudohypoparathyreoidismus erkrankte Patientin praktisch kaum auf PTH-Gabe reagiert, hat die Verabreichung des Hormones bei der Normalperson einen c-AMP-Peak zur Folge, der das ca. 70-fache des Mittelwertes vor der Infusion beträgt.

3.5.6.3. Beurteilung

Die Versuchsergebnisse machen deutlich, daß die Messung der Phosphat-Clearance-Änderung nach PTH-Gabe in diesem Fall eine Unterscheidung von Pseudohypoparathyreoidismus-Patienten von Normalpersonen erlaubt. Es ist vor allem die über sehr viel längere Zeit gesteigerte Phosphat-Clearance der Normalperson, durch die diese Differenzierung ermöglicht wird. Dies zwingt zu einer langen Sammelperiode, die weit über das Einpendeln

der Phosphatausscheidung um den ursprünglichen Wert bei der Pseudohypoparathyreoidismus-Patientin hinausgeht und bei Versuchspersonen und ärztlichem Personal zu einer erheblichen Mehrbelastung führt. Dieser Nachteil kann durch die Nukleotidbestimmung in diesem Fall offensichtlich umgangen werden. Der Betrag der c-AMP-Konzentrationsänderung ist nicht nur um ein Vielfaches größer als die Zunahme der Phosphat-Clearance, sondern erfolgt auch wesentlich schneller, so daß man die Länge des Testes einschränken kann.

4.

DISKUSSION

Seit es B. BUTCHER und E.W.SUTHERLAND (11) 1962 erstmals gelungen ist, mit einer relativ unempfindlichen Methode c-AMP im Urin nachzuweisen, hat die Bestimmung dieses Nukleotids im Urin auf Grund der physiologischen Gegebenheiten in der Niere (s. Einleitung) immer größere Bedeutung erlangt. Dabei wird der bestehende Zusammenhang zwischen Parathormonspiegel des Serums und Größe der c-AMP-Ausscheidung in den Urin genutzt, um Rückschlüsse auf eine Erkrankung der Nebenschilddrüse zu ziehen. Die Notwendigkeit dieses Vorgehens ergibt sich aus den Schwierigkeiten, die die Diagnostik des primären Hyperparathyreoidismus auch heute noch bereitet. Da eine Messung des Parathormonspiegels des Serums, als direkter Parameter, erst unter großen Schwierigkeiten und zur Zeit noch keineswegs zufriedenstellend - oder gar routinemäßig - möglich ist (s. Einleitung), benutzt man zur Diagnose des primären Hyperparathyreoidismus neben der Beobachtung des klinischen Bildes sowie der Laborwerte (Serum-Kalzium, anorganischer Phosphor im Serum, Kalziurie) vor allen Dingen das Verhalten indirekter Parameter, wie die Änderung der Phosphat-Clearance nach Kalzium-Suppression der Epithelkörperchen oder die tubuläre Rückresorption des anorganischen Phosphors (TRP in %, siehe 3.5.3.3.). Alle aufgeführten Möglichkeiten sind in der klinischen Durchführung aufwendig bzw. führen nicht immer zu einer klar faßbaren Diagnose. Eine Ergänzung dieser noch nicht restlos befriedigenden diagnostischen Möglichkeiten scheint die Bestimmung von c-AMP im Urin zu bieten, wie eine Anzahl von Publikationen gezeigt hat (26, 33, 39, 40, 46, 47, 49, 58, 65).

Da die Ergebnisse der einzelnen Forschergruppen hinsichtlich der klinischen Verwertbarkeit der c-AMP-Bestimmung bei der Diagnose des primären Hyperparathyreoidismus recht unterschiedlich sind, hatten wir uns zu einer eigenen Überprüfung entschlossen.

Ein wesentlicher Faktor für die Durchführung solcher Versuche ist die Wahl einer geeigneten Bestimmungsmethode für das Nukleotid. Obwohl es große chemische Stabilität besitzt, ist der Nachweis auf Grund seiner geringen Konzentration schwierig (siehe Kapitel 2). Nach gründlicher Beschäftigung mit den vorhandenen Bestimmungsmethoden haben wir uns für die Methode von A.G.GILMAN (23) entschieden, da sie nach unserer Meinung entscheidende Vorteile besitzt (s. 2.5.2.4.). Wir haben anfangs den von der Firma Boehringer, Mannheim (Bestell-Nr. 15289) in den Handel gebrachten Assay-Kit benutzt, der nach dieser Methode zusammengesetzt ist. Dieser Pipettiersatz gestattet jedoch nur 25 bis 30 Doppelbestimmungen, was sich hinsichtlich seines relativ hohen Preises als zu unwirtschaftlich erwiesen hat. Hinzu kommt, daß wir auf Grund der erhaltenen Eichkurven Bedenken hinsichtlich der Haltbarkeit und Reproduzierbarkeit dieses Assay-Kits gehabt haben. Aus diesen Gründen haben wir uns entschlossen, den wohl anfälligsten und deshalb auch teuersten Bestandteil des Kits, die Proteinkinase, selbst herzustellen. Die Darstellung der für die Methode von A.G.GILMAN erforderlichen c-AMP-spezifischen Proteinkinase ist relativ problemlos. Der Ertrag (bei unseren zwei Präparationen ausreichend für 1320 bzw. 3800 tubes), die große Haltbarkeit sowie die viel geringeren Kosten sind Argumente, die den Zeitaufwand von drei bis vier Tagen, der für die Herstellung des Enzyms erforderlich ist, bei weitem rechtfertigen. Die Benutzung dieses Enzyms hat bei unseren Versuchen zu einer guten Reproduzierbarkeit geführt, wie die Präzision in der Serie ($\bar{x}$ = 3.09 pMol/100 μ l; SD = 0.26 pMol/100 μ l; VK = 8.66 %) und die Wiederfindewerte von 98.5 ± 2.98 % beweisen.

Ein großer Vorteil bei der Messung von c-AMP im Urin ist die bereits erwähnte Stabilität des Nukleotids. Ein Aufbewahren der Urinproben bei Zimmertemperatur führt bis mindestens 48 Stunden zu keinem Abfall des c-AMP-Gehaltes (3.4.1.). Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen der

Literatur (22). Ebenfalls unempfindlich hat sich das Nukleotid gegenüber Auftauen und Wiedereinfrieren erwiesen, wobei selbst nach fünfmaliger Wiederholung keine Veränderung der c-AMP-Menge festgestellt werden konnte (3.4.2.). Als weiterer praktischer Vorteil der Versuchsdurchführung erweist sich die Tatsache, daß eine Verdünnung der verwendeten Urinproben von 1:100 wegen der großen Empfindlichkeit dieser Bestimmungsmethode möglich ist. Eine spezielle Aufbereitung der Proben ist deshalb nicht erforderlich.

Gestützt auf diese Ergebnisse haben wir versucht, die am meisten interessierenden klinischen Probleme der c-AMP-Ausscheidung zu beantworten:

Vorliegen einer Tagesrhythmik, Größe der Ausscheidung bei Normalpersonen, Diagnose und Differentialdiagnose des primären Hyperparathyreoidismus, prä- und postoperative c-AMP-Ausscheidung bei primärem Hyperparathyreoidismus sowie der Stimulierbarkeit der c-AMP-Ausscheidung durch Parathormongabe bei einer Patientin mit Pseudohypoparathyreoidismus.

Um festzustellen, ob die c-AMP-Ausscheidung in den Urin einer Tagesrhythmik unterliegt, ist der Urin von acht endokrinologisch und stoffwechselgesunden Personen in drei Stundenportionen gesammelt und untersucht worden. Dabei hat sich keine einheitliche Tagesrhythmik ergeben. Dieses Ergebnis widerspricht den Befunden von J. SAGEL (45), der bei ebenfalls acht untersuchten Patienten eine ausgesprochene Tagesrhythmik gefunden hat. Dagegen werden unsere Ergebnisse durch die Befunde von L.R.CHASE (14) bestätigt, wenn er auch nicht wie wir zum Teil beträchtliche individuelle Schwankungen der c-AMP-Ausscheidung gefunden hat. Inwieweit es sich hierbei um das Vorliegen einer individuellen Rhythmik handelt, müßte durch Tagesprofile an mehreren Tagen hintereinander bei den gleichen Personen überprüft werden. Nachdem bei uns eine pro Zeiteinheit individuell unterschiedliche c-AMP-Ausscheidung vorgelegen hat, haben wir uns entschlossen, für die Durchführung aller kommenden Versuche 24-Stunden-Urine zu verwenden und nicht aus kürzeren Sammelperioden auf 24 Stunden umzurechnen. Der c-AMP-Gehalt

dieser Urine hat bei 35 Normalpersonen im Mittel bei $5.18 \pm 1.48 \mu\text{Mol}/24\text{h}$ ($\bar{x} \pm s$; $N = 35$) gelegen. Um Normalpersonen möglichst einwandfrei vom Patientenkollektiv trennen zu können, sind von verschiedenen Autoren (39, 40, 47, 49) Parameter vorgeschlagen worden, die durch Einbeziehen in das Meßresultat zu einer größeren Trennschärfe führen sollen. Kreatininausscheidung sowie Kreatinin-Clearance scheinen die vielversprechendsten davon zu sein. Bei beiden kommt es zu einer Erniedrigung des Mittelwertes, vor allem aber zu einer Verkleinerung der Standardabweichung, wobei die Veränderungen bei Einbeziehen der Kreatinin-Ausscheidung nach unseren Untersuchungen am gravierendsten sind. Der sich dabei ergebende Mittelwert beträgt $3.15 \pm 0.85 \mu\text{Mol}/\text{g-Kreatinin}$ ($\bar{x} \pm s$; $N = 35$).

Die Ursache liegt in der im Mittel deutlich über einem Gramm liegenden Kreatinin-Tagesausscheidung der gesunden Erwachsenen, während die Kreatinin-Clearance-Werte unserer Normalpersonen im Mittel nur gering über 100 ml/min gelegen sind und so nahezu als Faktor 1 in die Rechnung eingehen. Der gefundene Mittelwert beträgt dabei $4.79 \pm 1.23 \mu\text{Mol}/100 \text{ ml/min}$ Kreatinin-Clearance ($\bar{x} \pm s$; $N = 19$).

Um die Frage beantworten zu können, ob es mit Hilfe der c-AMP-Messung möglich ist, Patienten mit primärem Hyperparathyreoidismus von Normalpersonen abzugrenzen, haben wir den Urin von zehn solcher Patienten untersucht. Neun dieser Patienten haben ein oder mehrere histologisch später gesicherte Epithelkörperchen-Adenome aufgewiesen, bei einem Patienten wurden zwar bei einer Operation vergrößerte Epithelkörperchen entfernt, die histologische Unterscheidung zwischen einem Adenom und einer Hyperplasie war auf Grund des unzureichenden histologischen Präparates jedoch nicht möglich. Die Kreatinin-Clearance-Werte dieser zehn Patienten sind in zwei Fällen mit 42 ml/min und 66 ml/min eingeschränkt gewesen, bei den restlichen acht Patienten lagen die Clearance-Werte zwischen 71 und

110 ml/min, also im Normbereich.

Bei diesen zehn untersuchten Patienten liegt die c-AMP-Ausscheidung in fünf Fällen im Normalbereich, wenn man die gemessenen Werte nur auf 24 Stunden bezieht. Dieses schlechte Ergebnis wird durch die Arbeit von P.H.DOHAN (17) nicht bestätigt, der - bei gleicher Auswertung - bei 11 von 16 Patienten mit primärem Hyperparathyreoidismus erhöhte c-AMP-Ausscheidung findet. Sein relativ gutes Ergebnis wird durch keinen der oben angegebenen Autoren erreicht. F.A.NEELON (40) findet genauso wie wir eine nahezu vollständige Überlappung von Normalkollektiv und Patienten, wenn er die c-AMP-Ausscheidung nur auf 24 Stunden bezieht. H. SCHMIDT-GAYK (47) und F. MURAD (39) kommen zu ähnlichen Ergebnissen.

Bezieht man die c-AMP-Ausscheidung auf 100 ml/min Kreatinin-Clearance als Parameter, fallen noch drei der zehn Patienten in den Normalbereich. Im Unterschied dazu erreicht H.SCHMIDT-GAYK (47), der das Einbeziehen der Kreatinin-Clearance in die Auswertung vorgeschlagen hat, mit Hilfe dieses Parameters eine vollständige Trennung zwischen 30 Normalpersonen und 18 Patienten mit primärem Hyperparathyreoidismus.

In unseren Fällen war die Diagnose bei Einbeziehen der Kreatinin-Ausscheidung am besten möglich (s. Abb. 12). Wir haben dabei im Mittel deutlich höhere c-AMP-Werte gefunden ($\bar{x} = 6.54$; $SD = 2.61 \mu\text{Mol/g-Kreatinin}$), obwohl sich auch bei dieser Art der Auswertung zwei Fälle von zehn im Normbereich befunden haben. Die Nierenfunktion beider Patienten ist mit einer Kreatinin-Clearance von 100 bzw. 80 ml/min nahezu normal gewesen. Die Fehlerquote von 20 % entspricht dem Ergebnis von H.SCHMIDT-GAYK (47), der bei gleicher Auswertung vier seiner achtzehn Patienten im Normbereich fand, ist jedoch etwas schlechter als die von F. MURAD (39), bei dem ein Patient von 16 normale c-AMP-Werte ausgeschieden hat. F.A.NEELON (40) kommt in seiner Arbeit zu ähnlichen Ergebnissen.

Um eine noch bessere Diskriminierung zu erreichen, führt F.A.NEELON zusätzlich zu den bereits bestehenden Parametern den dimensionslosen Faktor Ψ ein ($\Psi = 3.37 \text{ (}\mu\text{Mol c-AMP/g-Kreatinin) - (}\mu\text{Mol c-AMP/24h))$. 31 von 34 Patienten mit primärem Hyperparathyreoidismus haben Ψ -Werte gehabt, die größer als 11 gewesen sind, während 63 der 65 Kontrollpersonen Ψ -Werte kleiner als 11 aufgewiesen haben. Dieses gute Ergebnis können wir bei Anwendung dieses Verfahrens auf unsere Werte jedoch nicht bestätigen.

Diese recht unterschiedlichen Ergebnisse sind zumindest z.T. durch die jeweils relativ geringe Anzahl der untersuchten Patienten zurückzuführen. Eine bessere Abtrennung zwischen Normalpersonen und Patienten liesse sich vielleicht auch noch dadurch erreichen, daß man die gefundenen Normalwerte der c-AMP-Ausscheidung eventuell durch ein Normalkollektiv endokrinologisch und stoffwechselgesunder, bettlägeriger Patienten ergänzt, da F. MURAD (39) berichtet, daß ambulante Normalpersonen höhere c-AMP-Ausscheidungsraten hätten als stationäre.

Die Beobachtung von A.L.TAYLOR (58) und P.H.DOCHAN (17), daß bei Patienten mit Nierenfunktionsstörung die c-AMP-Ausscheidung herabgesetzt ist, können wir bestätigen. Korrektur der zu niedrigen Werte durch Zuhilfenahme der Kreatinin-Clearance, wie von H.SCHMIDT-GAYK (47) vorgeschlagen, wirkt sich jedoch nach unseren Ergebnissen erst bei sehr stark eingeschränkter Nierenfunktion differentialdiagnostisch positiv aus. So bei einer Patientin (E.U.) mit einer Kreatinin-Clearance von 52 ml/min. Obwohl bei einer Operation dieser Patientin drei Epithelkörperchen entfernt worden sind, die histologisch keine Anzeichen auf Adenom oder Hyperplasie aufgewiesen haben, besteht auf Grund fortwährender leichter Hyperkalziämien sowie fehlender Supprimierbarkeit der dringende klinische Verdacht auf primären Hyperparathyreoidismus. Während die c-AMP-Ausscheidung, bezogen auf 24 h und 24h-g-Kreatinin, im Normbereich liegt, bringt das Einbeziehen der

Kreatinin-Clearance als Parameter für die c-AMP-Ausscheidung einen deutlich über dem Normbereich liegenden Wert. Auf Grund dieser Ergebnisse sollte man zur Auswertung auf jeden Fall beide Parameter, also Berechnung der c-AMP-Ausscheidung auf Kreatinin-Ausscheidung und Kreatinin-Clearance zu Hilfe nehmen.

Die Unterscheidung von Patienten mit vermutetem Hyperparathyreoidismus von Normalpersonen ist mit Hilfe der c-AMP-Bestimmung, wenn überhaupt, so doch nur sehr begrenzt möglich. Fünf Patienten mit Nephrolithiasis und zum Teil grenzwertigen Serum-Kalziumspiegeln haben zwar erhöhte c-AMP-Ausscheidung aufgewiesen ($\bar{x} = 4.40$; $SD = 1.14 \mu\text{Mol/g-Kreat.}$), eine sichere Diagnose ist auf Grund der Überlappung mit dem Normalbereich in einzelnen Fällen jedoch nicht möglich. So lag die c-AMP-Ausscheidung bei zwei Patienten mit klinischem Verdacht auf pHPT klar im pathologischen Bereich, während sie bei zwei anderen Patienten mit entsprechenden klinischen Symptomen trotz Zuhilfenahme aller besprochenen Parameter im Normbereich blieb. Die c-AMP-Ausscheidung einer Patientin mit Verdacht auf pHPT und eingeschränkter Kreatinin-Clearance von 52 ml/min (s. 3.5.3.6.) wies bei Einbeziehen der Kreatinin-Clearance als Parameter eindeutig erhöhte Werte auf, während die c-AMP-Ausscheidung im Normbereich lag, wenn man sie auf "24h" oder "-g-Kreatinin" bezogen hat. Da bei all diesen Patienten noch keine histologische Verifizierung der Befunde vorgenommen werden konnte, ist eine weitere Interpretation dieser Ergebnisse noch nicht möglich.

Da die Frage der klinischen Bedeutung der c-AMP-Bestimmung zur Diagnose eines pHPT von entscheidender Bedeutung ist, haben wir die oben beschriebenen Ergebnisse mit den bisher üblichen differentialdiagnostischen Methoden (s.3.5.3.3.) verglichen. Es handelt sich dabei vor allen Dingen um die Änderung der Phosphat-Clearance nach Kalziumsuppression (30), sowie um die tubuläre Phosphatrückresorption. Beide Methoden führen nicht immer zu eindeutigen Ergebnissen. So haben

M.A.DAMBACHER et al. (14a) bei einem Vergleich dieser Methoden, bei denen zusätzlich noch die Bestimmung des Phosphatexkretionsindex (PEI) berücksichtigt worden ist, in 20 bis 30 % der Fälle Überlappungen des Normalbereichs mit den entsprechenden Werten bei Nebenschilddrüsenüberfunktion gefunden. Dabei scheint die Messung der Phosphat-Clearance noch die besten Ergebnisse zu liefern. M.A.DAMBACHER et al. (14a) haben bei 101 durchgeführten Suppressionstesten eine Treffsicherheit von 95 % erreicht (zwei falsch negative, drei falsch positive Ergebnisse). Dabei haben Normalpersonen nach Ca^{++} -Suppression eine Verminderung der Phosphat-Clearance von mehr als 45 % gegenüber dem Vortag aufgewiesen. Werte zwischen 35 % und 45 % haben als Übergangsbereich gegolten. In diesen Fällen ist der Test wiederholt worden, während eine Abnahme der Phosphat-Clearance von weniger als 35 % oder gar eine Steigerung der Phosphat-Clearance als pathologisch im Sinne eines pHPT gewertet worden sind.

Den Normalwert des Index der tubulären Phosphatrückresorption, der zwischen 85 % und 95 % liegt, haben wir von A. LABHART (30a) übernommen, wonach eine Erniedrigung unter 85 %, trotz erheblicher Überschneidung mit dem Normalbereich, für einen pHPT spricht.

Legt man diese Werte den von uns gefundenen Ergebnissen zugrunde, so stehen der Fehlerquote von 20 % bei den gesicherten pHPT-Patienten, die sich aus der c-AMP-Messung ergibt, 12.5 % (einer von acht) falsche Ergebnisse gegenüber, falls man sich auf die Phosphat-Clearance-Änderung stützt. Betrachtet man die tubuläre Phosphatrückresorption, so ergibt sich in unseren Fällen die beachtliche Fehlerquote von 40 %. Die direkte Bestimmung des Parathormons, auf die große Hoffnung gesetzt worden ist, weist verschiedene Nachteile auf (14a, S. 185) und kann zudem nur an wenigen klinischen Zentren durchgeführt werden (s. Einleitung). Die in dieser Arbeit unter 3.5.3.3. aufgeführten Werte sind uns freundlicherweise von Herrn Priv.Do. Dr. M. DAMBACHER (Bürgerspital, Basel) zur Verfügung gestellt worden. Wir haben damit eine Fehlerquote von ca. 30 % (zwei von sieben) erhalten. Diese Werte verdeutlichen sowohl die Schwierigkeiten

der Diagnostik als auch den Stellenwert der c-AMP-Bestimmung im Vergleich zu den anderen praktizierten Methoden.

Ein weiteres diagnostisches Problem ist die Frage, ob es mit Hilfe der c-AMP-Bestimmung möglich ist, Patienten mit Hyperkalziämien auf Grund eines pHPT von Patienten mit einer Hyperkalziämie bedingt durch einen Tumor völlig anderer Genese zu unterscheiden. P.H. DOHAN (17) findet bei allen untersuchten Patienten mit Karzinomen, die mit Hyperkalziämie einhergehen, zwar eindeutig erniedrigte c-AMP-Spiegel, der Wert dieser Angabe wird jedoch durch seinen sehr hohen Normalbereich von $6.20 \pm 0.5 \mu\text{Mol}/24\text{h}$ ($\bar{x} \pm s$; N = 18) eingeschränkt. Hinzu kommt, daß P.H.DOHAN als einziger der Autoren durch das Einbeziehen der Kreatinin-Ausscheidung keine bessere Trennung seines Normalkollektivs von pathologischen Fällen erzielen kann. Aussagekräftiger scheinen uns deshalb die Ergebnisse von F. MURAD (39) zu sein, bei dem drei Patienten mit Bronchialkarzinomen und Hyperkalziämie normale Mengen c-AMP ausscheiden, während ein Patient mit Sarkoidosis und Hyperkalziämie eine verminderte c-AMP-Ausscheidung aufweist. Wir haben vier Tumorpatienten mit Hyperkalziämie untersucht, die an einem Bronchialkarzinom, an einem Colonkarzinom, an einem malignen Melanom und an einem Mammakarzinom erkrankt gewesen sind. Drei davon hatten normale c-AMP-Werte des 24-Stunden-Urins, bei der vierten Patientin haben sich sogar erhöhte c-AMP-Werte gefunden. Die Interpretationsmöglichkeiten dieser vielleicht überraschenden Ergebnisse sind unterschiedlich:

Eine vorstellbare Möglichkeit für das Zustandekommen normaler c-AMP-Ausscheidung bei Suppression der Epithelkörperchen durch erhöhte Kalziumspiegel ist ein erhöhter c-AMP-Gehalt des Serums auf Grund multifaktorieller Stoffwechselaktivitäten bei Tumorpatienten. Dies führt über die vergrößerte glomeruläre Filtration von c-AMP zu einem normalen oder sogar erhöhten c-AMP-Gehalt des Urins, obwohl der aktiv sezernierte, parathormonabhängige Anteil deutlich geringer sein dürfte.

Eine zweite Möglichkeit ist das Vorliegen einer "ektopen Hormonbildung", d.h. Bildung von Parathormon oder einer Parathormon-ähnlichen Substanz durch den Tumor. N.I.KAMINSKY et al. (26) haben bei einem Patienten mit einem Lungenkarzinom ebenfalls erhöhte c-AMP-Werte gefunden, die nach Bestrahlen des Tumors wieder in den Normbereich gefallen sind. Diese Konstellation könnte für die eine Patientin mit erhöhter c-AMP-Ausscheidung zutreffen. Allerdings ist in diesem Fall ein primärer Hyperparathyreoidismus, der vielleicht unabhängig vom Tumor bestanden hat, nicht ausgeschlossen worden.

Eine dritte Möglichkeit der Erklärung bieten die physiologischen Gegebenheiten der Parathormonwirkung am proximalen Tubulus der Niere. Eine Stimulation der c-AMP-Ausscheidung durch Parathormongabe ist gut möglich (s.3.5.6.2.). Sie führt zu einem Anstieg des aktiv sezernierten Anteils bis auf 94 % (s. Einleitung). Suppression der Parathormonausscheidung führt dagegen lediglich zu einer Hemmung des aktiv sezernierten Anteils, der normalerweise nur 1/3 der Gesamtausscheidung beträgt und läßt den glomerulär filtrierten Anteil (2/3) völlig unbeeinflusst. Daraus folgt, daß die c-AMP-Ausscheidung nach Kalzium-Suppression nur auf maximal zwei Drittel des Ausgangswertes reduziert wird. Eine vollständige "Suppression" der c-AMP-Ausscheidung kann also nicht erfolgen. Unterstützt wird diese Überlegung durch unser Ergebnis (s.3.5.5.), bei dem bei einer Normalperson eine "c-AMP-Suppression" nach Kalzium-Infusion nicht festgestellt werden konnte, sowie durch die Versuche von N.I.KAMINSKY (26), bei dem eine Kalziuminfusion von 200 bis 300 mg die c-AMP-Ausscheidung nur um 20 - 45 % erniedrigt hat. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die c-AMP-Ausscheidung bei Patienten mit einer Hyperkalzämie, die durch einen Tumor bedingt ist, bei dem es sich nicht um ein Epithelkörperchenadenom handelt, in der Regel im Normbereich liegt, während Patienten mit primärem Hyperparathyreoidismus in den meisten von uns untersuchten Fällen eine erhöhte c-AMP-Ausscheidung aufweisen, die sich

jedoch nach erfolgreicher Operation normalisiert (s.3.5.4.).

Die Unterscheidung anderer Krankheitsbilder mit ossären Veränderungen vom pHPT, z.B. Osteomalazie, Osteoporose, Akromegalie, ist durch eine c-AMP-Bestimmung im 24-Stunden-Urin nicht möglich. Hier müssen andere differentialdiagnostische Kriterien angewendet werden. Interessant ist aber, daß auch bei diesen Krankheiten z.T. eine erhöhte c-AMP-Ausscheidung zu finden ist. Dies verdeutlicht zusammen mit den anderen Ergebnissen die Problematik der schwierigen Diagnostik des primären Hyperparathyreoidismus und damit auch der Wertigkeit der c-AMP-Bestimmung im Urin. Obwohl die Sensitivität der Methode zur Unterscheidung von Normalpersonen und an Hyperparathyreoidismus erkrankten Patienten groß ist, stellt sie doch auf Grund ihrer geringen differentialdiagnostischen Spezifität gegenüber anderen ossären Erkrankungen keine endgültig befriedigende Lösung der Probleme dar.

Die letzte Frage, die uns beschäftigt hat, betraf die Diagnostik bei Patienten mit dem Krankheitsbild eines Pseudohypoparathyreoidismus.

Der erstmals von R.ELLSWORTH und J.E.HOWARD (20) zum Beweis dieser seltenen Erkrankung vorgeschlagene Test, die praktisch fehlende Veränderung der Phosphatausscheidung nach Parathormongabe zu messen, ist zeitlich aufwendig und führt nicht selten zu zweifelhaften Ergebnissen (s.3.5.6.2.). Das Messen der c-AMP-Ausscheidung nach Parathormongabe hat in unserem Fall zu einer erheblich besseren Trennung von Normalperson und Patientin geführt. Der Betrag der c-AMP-Konzentrationsänderung ist nicht nur um ein Vielfaches größer als die Zunahme der Phosphat-Clearance, sondern erfolgt auch wesentlich schneller, so daß man die Länge des Testes einschränken kann. Allerdings ist nach neueren Erkenntnissen (18) denkbar, daß beide Parameter gemessen werden müssen, da es einen Pseudohypoparathyreoidismus Typ II gibt, der mit Hilfe der c-AMP-Messung allein nicht diagnostiziert werden kann. Die Störung liegt bei dieser Erkrankung nicht im Parathormonrezeptorsystem des proximalen Tubulus der Niere, sondern vermutlich in einem intrazellulären Defekt, der eine Weiterverarbei-

tung des Signals des "second messenger" nicht ermöglicht. Die c-AMP-Ausscheidung nach Parathormongabe ist bei solchen Pseudohypoparathyreoidismus-Patienten normal, im Gegensatz zum fehlenden Anstieg der Phosphat-Clearance. Beide Typen sollten nach dem Vorschlag der Arbeitsgruppe um A.M.MOSES (37) als Hypoparathyreoidismus der "Hormon-resistenten Form" bezeichnet werden, im Gegensatz zum Hypoparathyreoidismus der "Hormon-mangelnden Form". Die von F.ALBRIGHT (1) beschriebenen Erkrankungen mit charakteristischen Skelettveränderungen, die mit einer PTH-resistenten Hypokalziämie (Pseudohypoparathyreoidismus) oder mit Normokalziämie (Pseudo-Pseudohypoparathyreoidismus) einhergehen, sollten nach A.M.MOSES et al. (37) als "Albright Osteodystrophia hereditaria" bezeichnet werden, die mit oder ohne Hypoparathyreoidismus der oben beschriebenen Formen einhergehen kann. Dies hätte den großen Vorteil, daß man auf die verwirrenden Ausdrücke "Pseudohypoparathyreoidismus" und "Pseudo-Pseudohypoparathyreoidismus" verzichten könnte. Die Verwirrung in der Nomenklatur scheint jedoch für die gesamte Nebenschilddrüsendiagnostik symptomatisch zu sein. Wir glauben aber sagen zu können, daß die Bestimmung von c-AMP im Urin eine weitere Möglichkeit darstellt, die auftretenden diagnostischen Schwierigkeiten bei Erkrankungen der Nebenschilddrüse zu verringern. Eine allseits befriedigende Diagnose ist nach alleiniger Bestimmung des c-AMP im Urin sicher nicht möglich. Zusammen mit allen anderen bereits verfügbaren Möglichkeiten sollte man sich jedoch die schnelle und relativ einfache Bestimmung dieses Nukleotids im Urin zunutze machen.

5.

ZUSAMMENFASSUNG

Im ersten Teil dieser Arbeit sind die derzeit wichtigsten Bestimmungsmethoden von c-AMP kurz zusammengefaßt und auf ihre wesentlichen Vor- und Nachteile hin untersucht worden. Dabei hat sich die Methode von A.G.GILMAN (23) für unsere Zwecke, nämlich c-AMP im Urin zu bestimmen, als absolut am günstigsten erwiesen.

Diese Methode ist deshalb bezüglich ihrer Präzision, Richtigkeit, Empfindlichkeit und klinischen Verwertbarkeit vor allem zur Diagnose des primären Hyperparathyreoidismus untersucht worden. Die Herstellung eines c-AMP-bindenden Proteins (Proteinkinase), das die Voraussetzung solcher Versuche gewesen ist, hat sich dabei als relativ problemlos und wirtschaftlich erwiesen. Die mit Hilfe dieses Enzyms erhaltene Präzision der Bestimmungsmethode in der Serie ($\bar{x} = 3.09 \text{ pMol/100 } \mu\text{l}$; $\text{SD} = 0.26 \text{ pMol/100 } \mu\text{l}$; $\text{VK} = 8.66 \%$; $\text{N} = 20$) sowie die ermittelte Wiederfinderate im Urin von $98.5 \pm 2.98 \%$ ($\bar{x} \pm s$; $\text{N} = 8$) erweisen sich als zufriedenstellend. Die Eichkurve ist bei doppelt logarithmischer Auftragung im getesteten Bereich von 1 bis 20 pMol/100 μl linear und von ausreichender Steilheit. Als entscheidender Vorteil bei der praktischen Durchführung der Versuche hat sich die große Stabilität des Nukleotids erwiesen. 48-stündige Lagerung der Proben bei Zimmertemperatur sowie mehrmaliges Auftauen und Wiedereinfrieren führt zu keiner Änderung des c-AMP-Gehaltes. Auf Grund der großen Empfindlichkeit und Spezifität der Methode hat dabei eine einfache Verdünnung der zu messenden 24-Stunden-Urine von 1:100 mit aqua dest. genügt.

Die so bei einem Normalkollektiv von 35 Personen gefundene c-AMP-Ausscheidung während 24 Stunden hat im Mittel $5.18 \pm 1.48 \mu\text{Mol/24h}$ ($\bar{x} \pm s$) betragen. Wir haben diese Werte mit der c-AMP-Ausscheidung von zehn Patienten mit pHPT verglichen und dabei signifikant erhöhte Werte gegenüber denen des Normalkollektivs gefunden ($\mu\text{Mol/24h}$: $\bar{x} = 6.88$; $s = 2.26$). Da die Überlappung

der beiden Gruppen jedoch so groß gewesen ist, daß 50 % der histologisch gesicherten pHPT-Fälle noch im Normbereich gelegen sind, haben wir zur Auswertung auch noch die c-AMP-Ausscheidung auf die Kreatinin-Ausscheidung in g/24h (Normbereich: $3.15 \pm 0.85 \mu\text{Mol}$, $\bar{x} \pm s$) bzw. auf die Kreatinin-Clearance ($4.79 \pm 1.23 \mu\text{Mol}/100 \text{ ml/min}$, $\bar{x} \pm s$) bezogen. Das Kollektiv der pHPT-Fälle ist dabei im Mittel mit c-AMP-Werten von $6.54 \pm 2.61 \mu\text{Mol/g-Kreatinin}$ ($\bar{x} \pm s$) bzw. von $8.24 \pm 2.23 \mu\text{Mol}/100 \text{ ml/min}$ Kreatinin-Clearance ($\bar{x} \pm s$) besser abgrenzbar. Im Einzelnen liegen bei Bezug auf die Kreatinin-Ausscheidung nur noch zwei der zehn pHPT-Patienten im Normbereich (20% falsch negative Ergebnisse), während bei Einbeziehen der Kreatinin-Clearance auch noch ein Dritter im Normbereich gelegen ist (30% falsch negative Ergebnisse).

Diese Ergebnisse sind mit anderen, zum Teil bereits seit langer Zeit in die Diagnostik der Epithelkörperchenerkrankungen eingeführten Parametern verglichen worden. Es handelt sich dabei um die Bestimmung der Phosphat-Clearance vor und nach Kalzium-Suppression nach L.H.KYLE (30), die Bestimmung der tubulären Phosphatrückresorption (TRP), sowie in einigen Fällen die direkte Messung des Parathormons mit Hilfe eines Radioimmunoassays. Dabei ergibt sich lediglich im Falle der Phosphat-Clearance-Änderung vor und nach Kalziumgabe mit nur 12.5 % (einer von acht) falsch negativer Werte ein besseres Ergebnis. Demgegenüber hat die Messung der tubulären Phosphatrückresorption mit 40 % (4 von 10) und selbst die direkte Bestimmung des Parathormons mit nahezu 30 % (2 von 7) falsch negativer Ergebnisse eine schlechtere Übereinstimmung hinsichtlich der gesicherten Diagnose ergeben.

Obwohl aus diesen Werten auf Grund unseres kleinen Patientenkollektivs keine absolute Rangfolge der klinischen Wertigkeit der einzelnen Methoden erstellt werden kann, läßt sich daraus doch die Berechtigung ableiten, die Bestimmung der c-AMP-Ausscheidung zusätzlich in das diagnostische Programm mit aufzunehmen, z.B. auch als Verlaufskontrolle vor und nach einer Epithel-

körperchenoperation, wie wir das bei einem unserer Patienten gemacht haben, dessen präoperativ zu hohe c-AMP-Ausscheidung nach der erfolgreichen Operation in den Normalbereich abfiel.

Die Bestimmung der c-AMP-Ausscheidung bei fünf Patienten mit einem auf Grund der anamnestischen und klinischen Daten vermuteten pHPT hat zu keinem einheitlichen Ergebnis geführt. Die c-AMP-Ausscheidung liegt in zwei Fällen im Normbereich, in zwei Fällen oberhalb der oberen Normgrenze, welchen Parameter man auch zugrundelegt. Bei einem Patienten liegen die Werte je nach Parameter zum Teil im pathologischen und zum Teil im normalen Bereich. Da auch die Bestimmung der Phosphat-Clearance, der tubulären Phosphatrückresorption sowie der direkten Parathormonbestimmung keine weitere Klarheit über die Richtigkeit der Diagnose erbracht hat, ist bis zur endgültigen chirurgisch-histologischen Klärung keine eindeutige Interpretation der erhaltenen Ergebnisse möglich.

Ein weiteres Problem kann die Differentialdiagnose zwischen einer Hyperkalziämie auf Grund eines pHPT und einer Hyperkalziämie völlig anderer Genese sein. Wir haben die diagnostische Wertigkeit der c-AMP-Ausscheidung im 24-Stunden-Urin für diese Differentialdiagnose in einzelnen Fällen untersucht. Und zwar haben wir die c-AMP-Ausscheidung von Patienten mit Hyperkalziämie gemessen, die an einem malignen Melanom, an einem Bronchialkarzinom, an einem Colonkarzinom und an einem Mammarkarzinom erkrankt gewesen sind. Drei dieser Patienten haben normale, einer sogar erhöhte c-AMP-Werte im 24-Stunden-Urin aufgewiesen. Die verschiedenen Interpretationsmöglichkeiten ("multifaktorielle Stoffwechselaktivitäten" von Tumorpatienten, "ektope Hormonproduktion", die physiologischerweise nicht mögliche Supprimierbarkeit des glomerulär filtrierten Anteils (ca. 2/3) der c-AMP-Ausscheidung) dieser auf den ersten Blick überraschenden Ergebnisse werden diskutiert. Patienten mit anderen Erkrankungen, die sich auch am Skelettsystem manifestieren, wie z.B. Osteomalazie, Osteoporose und Akromegalie, haben

zum Teil auch eine erhöhte c-AMP-Ausscheidung im 24-Stunden-Urin gehabt. Diese Fälle müssen durch andere differential-diagnostische Kriterien geklärt werden.

Der letzte Teil der Arbeit befaßt sich mit dem seltenen Krankheitsbild des Pseudohypoparathyreoidismus, bei dem entweder eine Störung am Parathormonrezeptor der Niere vorliegt, oder die Übertragung des "Hormonbefehls" innerhalb der Zelle nicht funktioniert. Bei der hier untersuchten Patientin, die offensichtlich in die erste Gruppe einzuordnen ist, hat sich die c-AMP-Bestimmung als wertvoll erwiesen. Sie hat gegenüber der klassischen Methode von R.ELLSWORTH und J.E.HOWARD (20) schneller und eindeutiger zu einer Unterscheidung der Patientin von einer Normalperson geführt.

5. SUMMARY

The first part of this paper deals with c-AMP-assays which are summarized and examined concerning their essential advantages and disadvantages. A.G.GILMAN's (23) method of evaluating c-AMP in the urine has proven most suitable for our purposes.

Therefore this method has been examined concerning its precision, accuracy, sensitivity and clinical usefulness, especially for the diagnosis of primary hyperparathyroidism. The preparation of a c-AMP binding protein (protein kinase) which is essential for these studies has proven to be easy and simple. The precision of the method in the series ($\bar{x}$ = 3.09 pmoles/100 μ l; SD = 0.26 pmoles/100 μ l; coefficient of variation = 8.66 %; N = 20) as well as the recovery rate from the urine of 98.5 $\pm$ 2.98 % ($\bar{x}$ $\pm$ s; N = 8) was satisfactory. The standard curve - plotted double logarithmically - was linear and sufficiently steep from 1 to 20 pmoles/100 μ l. The great stability of the nucleotid was an important advantage during the experiments. The storage of the samples at room temperature for 48 hours as well as the repeated thawing and refreezing did not cause any alteration of the c-AMP. Because of the great sensitivity

and specificity of the method a 24-hour-urine specimen diluted 1:100 with distilled water could be measured. The c-AMP excretion of 35 normal persons during 24 hours averaged $5.18 \pm 1.48 \mu\text{moles}/24\text{h}$ ($\bar{x} \pm s$). We compared these results with the c-AMP-excretion of ten patients with pHPT. In these patients c-AMP excretion was significantly increased compared to normals ($\mu\text{moles}/24\text{h}$: $\bar{x} = 6.88$; $s = 2.26$). Since there was a considerable overlap between the two groups, 50 % of the histologically documented pHPT-cases had still normal values. Therefore we have compared the secretion of c-AMP with the secretion of creatinin in g/24h (standard value : $3.15 \pm 0.85 \mu\text{moles}$, $\bar{x} \pm s$) respectively with the creatinin clearance ($4.79 \pm 1.23 \mu\text{moles}/100 \text{ ml}/\text{min}$; $\bar{x} \pm s$). Thus on average the groups of pHPT-patients could be better defined with c-AMP-values of $6.54 \pm 2.61 \mu\text{moles}/\text{g-creatinin}$ ($\bar{x} \pm s$) respectively of $8.24 \pm 2.23 \mu\text{moles}/100 \text{ ml}/\text{min creatinin-clearance}$ ($\bar{x} \pm s$). There were only two out of ten pHPT-patients who could not be discriminated on the basis of these data. This has been compared to other parameters introduced into the diagnosis of parathyroid diseases assaying such as phosphate-clearance before and after calcium-suppression (L.H.KYLE (30)) the tubular reabsorption of phosphate (TRP) and in some cases measurement of the parathormone by radioimmunoassay. Only the phosphat-clearance before and after calcium gives better results with only 12.5 % (one out of eight) false results. On the other hand the tubular reabsorption of phosphate was less accurate in predicting the right diagnosis with 40 % (4 out of 10) and even the parathormone assay with nearly 30 % (2 out of 7) wrong results. Even if it is not possible to range according to priority of the clinical value of the different methods by means of our data because of our small number of patients, one can, however, include the measurement of c-AMP-excretion into the diagnostic evaluation of patients before and after parathyroid surgery, as we have done in one of our patients, whose preoperatively very high c-AMP-excretion fell to normal range as a result of a

successful operation.

The measurement of c-AMP-excretion of 5 patients with a pHPT, whose diagnosis were based on anamnestic and clinical grounds has not led to uniform results. The c-AMP-secretion in two cases was normal, in two cases above the upper norm. It made no difference whether c-AMP was calculated per g-creatinine or creatinine-clearance. The fifth patient's values were partly in the pathological, partly in the normal range. Since neither phosphat-clearance nor the TRP nor the parathormone assay could substantiate the diagnosis, a definitive interpretation of these values won't be possible until surgery.

The differential diagnosis between a hypercalcemia due to pHPT and hypercalcemia of a totally different origin may be another problem. We have examined the diagnostical value of c-AMP-excretion in 24-hour-urine for this differential diagnosis in individual cases. We have measured c-AMP-excretion in patients with hypercalcemia with malignant melanoma, bronchial carcinoma, colon carcinoma and mammary cancer. Three of these patients had normal c-AMP-values in the 24-hour-urine, one of them had an elevated one. The different possibilities for interpretation (multifactorial metabolic activities in tumor patients, "ectopic hormone production", the physiological non-suppressability of the glomerularenly filtrated (about 2/3) c-AMP-secretion) of these at first sight surprising results are discussed.

Patients with other skeletal diseases as osteomalacia, osteoporosis and acromegaly can also have elevated c-AMP-secretion in the 24-hour-urine as well. These patients have to be evaluated differently in order to make the diagnosis.

The last part of this paper deals with the rare clinical picture of pseudohypoparathyroidism, where there is either a disturbance at the parathormone-receptor of the kidney or a defect inside the target cell. The c-AMP-assay has proven to be effective in one patient examined who obviously belongs

to the first group. The c-AMP-assay has led to a faster and more definite discrimination of this patient from a normal person compared to the classic method of R. ELLSWORTH and J.E.HOWARD (20).

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. ALBRIGHT, F., C.H.BURNETT, P.H.SMITH, and W.PARSON:
Pseudohypoparathyroidism - an example of
"Seabright-Bantam syndrome".
Endocrinology 30, 922 (1942)
2. AURBACH, G.D., B.A.HOUSTON:
Determination of $3:5^2$ -Adenosine Monophosphate
with a method based on a radioactive phosphate
exchange reaction.
J.Biol.Chem. 243, 5935-5940 (1968)
3. BRECKENRIDGE, B., McL.:
The measurement of cyclic adenylate in tissues.
Proc.Nat.Acad.Sc. 52, 1580-1586 (1964)
4. BROOKER, G., M.M.APPLEMAN:
The theoretical basis for the measurement
of compounds by enzymatic radioisotopic dis-
placement.
Biochem. 7, 4182-4184 (1968)
5. BROOKER, G.:
High-pressure anion exchange chromatography
and enzymatic isotope displacement assays
for cyclic AMP and cyclic GMP.
In: Advances in cyclic nucleotide research,
Vol. 2.
Ed.: Greengard P., Robison G.A., New York,
Raven Press, p.111-129 (1972)
6. BROSTROM, C.O., F.L.HUNKELER, E.G.KREBS:
The regulation of skeletal muscle phosphorylase
kinase by Ca^{++} .
J.Biol.Chem. 246, 1961-1967 (1971)
7. BROSTROM, M.A., E.M.REIMANN, D.A.WALSH, and E.G.KREBS:
A cyclic $3:5^2$ -AMP stimulated protein kinase from
cardiac muscle.
In: Advances in Enzyme Regulation, Vol. 8,
New York, Pergamon Press, p.191-203
8. BROWN, B.L., J.D.M.ALBANO, R.P.EKINS and A.M.SGHERZI:
A simple and sensitive assay method for the
measurement of adenosine $3:5^2$ -cyclic monophosphate.
Biochem.J. 121, 561-562 (1971)
9. BROWN, E., D.L.CLARKE, V.ROUX, and G.H.SHERMAN:
The stimulation of adenosine $3:5^2$ -monophosphate
production by antidiuretic factors.
J.Biol.Chem. 238 PC 852-853 (1963)

10. BUTCHER, F.R.:
A rapid filter paper disk assay for picomole amounts of cyclic AMP using a cyclic AMP dependent protein kinase.
Horm.Metab.Res. 3, 336-340 (1971)
11. BUTCHER, R.W., E.W.SUTHERLAND:
Adenosine 3':5'-phosphate in biological materials.
J.Biol.Chem. 237, 1244-1250 (1962)
12. CASTAGNA, M.:
A microdetermination of cyclic AMP based upon activation of a liver protein kinase.
FEBS-Letters 8, 289-292 (1970)
13. CHASE, L.R., G.D.AURBACH:
Parathyroid function and the renal excretion of 3':5'-adenylic acid.
Proc.Nat.Acad.Sc. 58.1, 518-525 (1967)
14. CHASE, L.R., G.L.MELSON, and G.D.AURBACH:
Pseudohypoparathyroidism: Defective excretion of 3':5'-AMP in response to parathyroid hormone.
J.Clin.Invest. 48, 1832-1844 (1969)
- 14a. DAMBACHER, M.A., P.C.SCRIBA, H.G.HAAS:
In: Endokrinologie für die Praxis, Teil I-III
Hrsg. K.Schwarz und P.C.Scriba,
J.F.Lehmann Verlag, München
S. 188 ff.
15. DAVOREN, P.R., E.W.SUTHERLAND:
The effect of L-epinephrine and other agents on the synthesis and release of adenosine 3':5'-phosphate by whole pigeon erythrocytes.
J.Biol.Chem. 238, 3009-3015 (1963)
16. DAVOREN, P.R., E.W.SUTHERLAND:
The cellular location of adenyl cyclase in the pigeon erythrocyte.
J.Biol.Chem. 238, 3016-3023 (1963)
17. DOHAN, P.H., Y.KAMEJIRO, P.L.REED, B.DAVIS, L.DEFTOS, and J.B.FIELD:
Evaluation of urinary cyclic 3':5'-adenosine monophosphate excretion in the differential diagnosis of hypercalcemia.
J.Clin.Endocrinol.Metab. 35, 775-784 (1972)
18. DREZNER, M., F.A.NEELON, and H.E.LEBOVITZ:
Pseudohypoparathyroidism Type II: A possible defect in the reception of the cyclic AMP signal.
New Engl.J.Med. 289, 1056-1060 (1973)

19. EBADI, M.S.:
Firefly luminescence in the assay of cyclic AMP.
In: Advances in Cyclic Nucleotid Research,
Vol. 2. Ed.: P.Greengard, G.A.Robison,
New York, Raven Press, p.89-108
20. ELLSWORTH, R., J.E.HOWARD:
Studies on the physiology of the parathyroid glands. VII. Some responses of normal human kidneys and blood to intravenous parathyroid extract.
Bull. Johns Hopkins Hosp. 55, 296
Ex.: 14 dieser Arbeit
- 20a. FISCHER, J.A., U.BINSWANGER, and F.M.DIETRICH:
Human parathyroid hormone. Immunological characterization of antibodies against a glandular extract and the synthetic amino-terminal fragments 1-12 and 1-34 and their use in the determination of immunoreactive hormone in human sera.
J.Clin.Invest. 54, 1382-1394 (1974)
21. FISKE, C.H., Y.SUBBAROW:
The colorimetric determination of phosphorus.
J.Biol.Chem. 66, 375-400 (1925)
22. GERBITZ, K.D., O.H.WIELAND:
Extrazelluläre cyclische Nukleotide: Vorkommen, Analytik und diagnostische Bedeutung.
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. Heft 6, 11.Jahrg.1973, 224-232.
23. GILMAN, A.G.:
A protein binding assay for adenosine 3':5'-cyclic monophosphate.
Proc.Nat.Acad.Sc. 67, 305-312 (1970)
24. GOLDBERG, N.D., J.LARNER, H.SASKO, and A.G. O'TOOLE:
Enzymic analysis of cyclic 3':5'-AMP in mammalian tissues and urine.
Anal.Biochem. 28, 523-544 (1969)
- 24a. HAAS, H.G., M.A.DAMBACHER, I.GUNCAGA, and LAUFFENBURGER:
Renal effects of calcitonin and parathyroid extract in man.
J.Clin.Invest. 50, 2689-2702 (1971)
25. JOHNSON, R.A., J.G.HARDMAN, A.E.BROADUS, and E.W.SUTHERLAND:
Analysis of adenosine 3':5'-monophosphate with luciferase luminescence.
Anal.Biochem. 35, 91-97 (1970)

26. KAMINSKY, N.J., A.E.BROADUS, J.G.HARDMAN, D.J.JONES jr.,
J.H.BALL, E.W.SUTHERLAND, and G.W.LIDDLE:
Effects of parathyroid hormone on plasma and
urinary adenosine 3:5²-monophosphate in man.
J.Clin.Invest. 49, 2387-2395 (1970)
27. KANEKO, T., J.B.FIELD:
A method of determination of 3:5²-cyclic adenosine
monophosphate based on adenosine triphosphate
formation.
J.Lab.Clin.Med. 74, 682-690 (1969)
28. KUO, J.F., P.GREENGARD:
Cyclic nucleotide-dependent protein-kinases.
J.Biol.Chem. 245, 4067-4073 (1970)
29. KUO, J.F., T.P.LEE, P.L.REYES, K.G.WALTON, T.E.DONNELLY j
and P.GREENGARD:
Cyclic nucleotide-dependent protein-kinases.
J.Biol.Chem. 247, 16-22 (1972)
30. KYLE, L.H., M.SCHAAF, and J.J.CANARY:
Phosphate clearance in the diagnosis of para-
thyroid dysfunction.
Amer.J.Med. 24, 240-248 (1958)
- 30a. LABHART, A.:
Klinik der inneren Sekretion.
2. Auflage. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-
New York, S.981 f.
31. LANGAN, A.T.:
Histone phosphorylation: Stimulation by
adenosine 3:5²-monophosphate.
Science 162, 579-580 (1968)
32. LANGAN, A.T.:
Protein kinases and protein kinase substrates.
In: Advances in Cyclic Nucleotide Research.
Vol. 3. Ed.: P.Greenard, G.A.Robison,
New York, Raven Press, p.99-153 (1973)
33. LILIENTFELD-TOAL, von, H., M.HÜFNER, R.D.HESCH:
PTH-infusion and estimation of urinary c-AMP
in hyperparathyroidism.
Acta endocr., Suppl. 173, 164 (1973)
34. LIPKIN, D., W.H.COOK, and R.MARKHAM:
Adenosine 3:5²-phosphoric acid: A proof of
structure.
J.Am.Ch.Soc. 81.4, 6198-6203 (1959)

35. MIYAMOTO, E., J.F.KUO, and P.GREENGARD:
Adenosine-3':5'-monophosphate-dependent protein
kinase from brain.
Science 165, 63-65 (1969)
36. MIYAMOTO, E., J.F.KUO, and P.GREENGARD:
Cyclic nucleotide-dependent protein kinases.
J.Biol.Chem. 244, 6395-6402 (1969)
37. MOSES, A.M., K.J.RAO, R.COULSON, and M.MILLER:
Parathyroid hormone deficiency with Albright's
hereditary osteodystrophie.
J.Clin.Endocrin.Med.: 39, 496-500 (1974)
38. MURAD, F., T.W.RALL, and M.VAUGHAN:
Conditions for the formation, partial puri-
fication and assay of an inhibitor of adenosine
3':5'-monophosphate.
Biochim.et Biophys. Acta 192, 193, 430-445
(1969)
39. MURAD, F. C.Y.C.PAK:
Urinary excretion of adenosine-3':5'-monophosphate
and guanosine 3':5'-monophosphate.
New Engl.J.Med. 286, 1382-1387 (1972)
40. NEELON, F.A., M.DREZNER, B.M.BIRCH, and H.E.LEBOVITZ:
Urinary cyclic adenosine monophosphate as an
aid in the diagnosis of hyperparathyroidism.
Lancet 1973/I, 631-634
41. PAUK, G.L., W.J.REDDY:
Measurement of adenosine 3':5'-monophosphate.
Anal.Biochem. 21, 298-307 (1967)
42. POSNER, J.B., K.E.HAMMERMEISTER, G.E.BRATVOLD, and
E.G.KREBS:
The assay of adenosine-3':5'-phosphate in
skeletal muscle.
Biochem. 3, 1040-1044 (1964)
43. RALL, T.W., E.W.SUTHERLAND:
Formation of a cyclic adenine ribonucleotide
by the tissue particles.
J.Biol.Chem. 232, 1065-1076 (1958)
44. RODBARD, D., W.BRIDSON, and P.L.RAYFORD:
Rapid calculation of radioimmunoassay results.
J.Lab.Clin.Med. 74, 770-781 (1969)
45. SAGEL, J., J.A.COLWELL, C.B.LOADHOLT, and G.LIZARRALDE:
Circadian rhythm in the urinary excretion of
cyclic 3':5'-adenosine monophosphate in man.
J.Clin.Endocrinol.Metab. 37, 570-573 (1973)

46. SCHMIDT-GAYK, H., H.D.RÖHER, and H.W.SEBERTH:
Bestimmung von cyclischem Adenosin-3:5'-
Monophosphat (c-AMP) im Harn zur Diagnose des
primären Hyperparathyreoidismus.
Chirurg 44, 272-274 (1973)
47. SCHMIDT-GAYK, H., H.SEITZ, E.RITZ, und E.BÖHME:
Primary hyperparathyroidism: Influence of renal
function on urinary cyclic AMP.
Acta endocr., Suppl. 184, 174 (1974)
48. SCHNEIDER, W., T.SZANTO, und G.TRAUT:
Zyklisches Adenosinmonophosphat und Nieren-
insuffizienz.
Klin.Wschr. 52, 1175-1176 (1974)
49. SCHWILLE, P.O., N.M.SAMBERGER:
Urinary and plasma 3:5'-cyclic AMP (cAMP) in
renal calcium stone patients and primary
hyperparathyroidism. Response to exogenous
calcium and EDTA.
Acta endocr., Suppl. 193, 33 (1975)
50. SCOTT, N.S., J.R.FALCONER:
Enzymic assay of adenosine 3:5'-monophosphate.
Anal.Biochem. 13, 71-73 (1965)
51. STEINER, A.L., D.M.KIPNIS, R.UTIGER, and C.PARKER:
Radioimmunoassay for the measurement of
adenosine-3:5'-cyclic phosphate.
Proc.Nat.Acad.Sc. 64, 367-373 (1969)
52. STEINER, A.L., C.W.PARKER, and D.M.KIPNIS:
Radioimmunoassay for cyclic nucleotides.
J.Biol.Chem. 247, 1106-1113 (1972)
53. STEINER, A.L., A.S.PAGLIARA, L.R.CHASE, and D.M.KIPNIS:
Radioimmunoassay for cyclic nucleotides.
J.Biol.Chem. 247, 1114-1120 (1972)
54. STEINER, A.L.:
Cyclic AMP and cyclic GMP.
In: Methods of Hormone Radioimmunoassay.
Ed.: B.M.Jaffe, H.R.Behrman,
New York, London. Academic Press, p.3-17 (1974)
55. SUTHERLAND, E.W., T.W.RALL:
Fractionation and characterization of a cyclic
adenine ribonucleotide formed by tissue particles.
J.Biol.Chem. 232, 1077-1091 (1958)

56. SUTHERLAND, E.W.: Studies on the mechanism of hormone action.
Science 177, 401-408 (1972)
57. TAO, M., M.L.SALAS, and F.LIPMANN:
Mechanism of activation by adenosine 3':5'-cyclic monophosphate of a protein phosphokinase from rabbit reticulocytes.
Proc.Nat.Acad.Sc. 67, 408-414 (1970)
58. TAYLOR, A.L., B.B.DAVIS, L.G.PAWLSON, and J.B.JOSIMOVICH:
Factors influencing the urinary excretion of 3':5'-adenosine monophosphate in humans.
J.Clin.Endocrin. 30, 316-324 (1970)
59. TURTLE, J.R., D.M.KIPNIS:
A new assay for adenosine-3':5'-cyclic monophosphate in tissue.
Biochem. 6, 3970-3976 (1967)
60. WALSH, D.A., J.P.PERKINS, and E.G.KREBS:
An adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle.
J.Biol.Chem. 243, 3763-3765 (1968)
61. WALSH, D.A., C.D.ASHBY, C.GONZALES, D.CALKINS, E.H.FISCHER, and E.G.KREBS:
Purification and characterization of a protein inhibitor of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinases.
J.Biol.Chem. 246, 1977-1985 (1971)
62. WALTON, G.M., L.D.GARREN:
An assay for adenosine-3':5'-cyclic monophosphate based on the association of the nucleotide with a partially purified binding protein.
Biochem. 9, 4223-4229 (1970)
63. WASTILA, W.B., J.T.STULL, S.E.MAYER, and D.A.WALSH:
Measurement of cyclic 3':5'-adenosine monophosphate by the activation of skeletal protein kinase.
J.Biol.Chem. 246, 1996-2003 (1971)
64. WELLER, M., R.RODNIGHT, and D.CARRERA:
Determination of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate in cerebral tissues by saturation analysis.
Biochem. J. 129, 113-121 (1972)
65. WILLIAMS, R.H., J.BARISH, and J.W.ENSINCK:
Hormone effects upon cyclic nucleotide excretion in man.
Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 139, 447-454 (1972)

66. WOMBACHER, H., F.KÖRBER:
A simple competitive protein binding assay
for cyclic adenosine 3':5'-monophosphate.
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 10.Jhrg. 1972, 260-266
67. WUNDERWALD, P., G.JURZ, und G.MICHAL:
Quantitative Bestimmung von A-3:5-MP, cyclisch,
mit der Isotopenverdünnungsmethode.
Aktuelle Biochemie, Boehringer Mannheim,
2M.772.71, Abstrakt aus dem Vortrag, gehalten
auf der Tagung für Biochemische Analytik 1972,
München.
68. YALOW, R.S., S.A.BERSON:
Immunoassay of endogenous plasma insulin in man.
J.Clin.Invest. 39, 1157-1175 (1960)
69. YAMAMURA, H., A.KUMON, K.NISHIYAMA, M.TAKEDA, and
Y.NISHIZUKA:
Characterization of two adenosine 3:5-mono-
phosphate-dependent protein kinases from rat liver.
Biochim.Biophys.Res.Comm. 45, 1560-1566 (1971)

Zu danken habe ich

Herrn Professor Dr.med. P.C. Scriba für die freundliche Überlassung des Themas sowie die menschliche Flexibilität in entscheidenden Phasen dieser Arbeit,

Herrn Dr.med. O.A. Müller für seine unermüdliche Unterstützung und sein psychologisches Geschick, ohne das diese Arbeit nicht zustandegekommen wäre,

Herrn Priv.Do. Dr.med. M. Dambacher für seine spontane Bereitschaft zur Zusammenarbeit über Laborgrenzen hinaus,

Herrn L. Bestler für die bereitwillige Anfertigung der Abbildungen,

Frau M. Ebner, die mit seltener Begeisterung den größten Teil der Kreatininbestimmungen erledigte, sowie Frau E. Arnold, Frau U. Scheel, Herrn R. Gerzer, die nicht unwesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Danken möchte ich auch den übrigen Doktoranden und Angestellten für die angenehme Zusammenarbeit.

LEBENS LAUF

Ich wurde am 18. Juli 1950 als Sohn des Ehepaares Katharina und Erwin Deckardt in München geboren. Dort besuchte ich die Volksschule und trat 1960 in das mathematisch-naturwissenschaftliche Erasmus-Grasser-Gymnasium über, das damals noch den Namen Ludwigs-Oberrealschule führte. Nach dem Abitur im Jahre 1970 begann ich im Winter-Semester desselben Jahres an der Ludwig-Maximilians-Universität mit dem Studium der Humanmedizin. Im Herbst 1971 legte ich den naturwissenschaftlichen Teil der ärztlichen Vorprüfung ab, im Frühjahr 1973 bestand ich die ärztliche Vorprüfung mit der Note sehr gut.

Von Sommer 1973 bis Frühjahr 1975 arbeitete ich in den Laboratorien für klinische Chemie und Endokrinologie der II. Medizinischen Klinik der Universität an dieser Dissertation.

Mitte 1976 werde ich voraussichtlich das Studium mit dem ärztlichen Staatsexamen beenden.

